

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 312**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/567** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2008 E 08738299 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2152905**

54 Título: **Métodos y kits para detectar células fetales en la sangre materna**

30 Prioridad:

**01.05.2007 US 924149 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.03.2016**

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH  
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.  
(100.0%)  
THE CHAIM SHEBA MEDICAL CENTER  
TEL HASHOMER, 52621 RAMAT-GAN, IL**

72 Inventor/es:

**GUETTA, ESTHER;  
BARKAI, GAD y  
GUTSTEIN-ABO, LIAT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 564 312 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para detectar células fetales en la sangre materna

- 5 La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para identificar un trofoblasto de acuerdo con la reivindicación 1, un método *ex vivo* para aislar un trofoblasto de acuerdo con la reivindicación 2, un método para ensayo de un embarazo de acuerdo con la reivindicación 4, un método *ex vivo* para diagnóstico prenatal de un producto de la concepción (*conceptus*) de acuerdo con la reivindicación 5, un método *ex vivo* para generar un cultivo de trofoblastos de acuerdo con la reivindicación 7.
- 10 El diagnóstico prenatal implica la identificación de anomalías cromosómicas y/o enfermedades genéticas en un feto humano. La práctica actual para detectar anomalías cromosómicas tales como la presencia de cromosomas adicionales [por ejemplo, la afección más común, la Trisomía 21 (síndrome de Down); síndrome de Klinefelter (47, XXY); Trisomía 13 (síndrome de Patau); Trisomía 18 (síndrome de Edwards); 47, XYY; 47, XXX], ausencia de cromosomas [por ejemplo, síndrome de Turner (45, X)], diversas translocaciones y supresiones, así como diagnóstico de enfermedades genéticas (por ejemplo, Fibrosis Quística, Enfermedad de Tay-Sachs) implica procedimientos invasivos, toma de muestras principalmente en vellosidades coriónicas (CVS) y/o amniocentesis.
- 15 Dado que el aumento de riesgo de síndrome de Down en embarazos de edad materna avanzada, en la mayoría de los países del mundo occidental, el diagnóstico prenatal se ofrece a mujeres mayores de 35 años, así como a mujeres de las que se sabe que son portadoras de enfermedades genéticas o anomalías cromosómicas (por ejemplo, translocaciones equilibradas). Por lo tanto, el riesgo de una mujer embarazada mayor de 35 años de edad para dar a luz a un bebé con una anomalía cromosómica detectable se ha reducido radicalmente. Sin embargo, debido a la falta de diagnóstico prenatal en mujeres más jóvenes, aproximadamente un 80 % de los niños con síndrome de Down nacen de mujeres embarazadas menores de 35 años.
- 20 La CVS o la amniocentesis son procedimientos invasivos que conllevan un 2-4 % o un 0,5-1,0 %, respectivamente, de riesgos relacionados con el procedimiento de aborto involuntario. En estos procedimientos, las células fetales en la muestra se someten directamente ensayo con análisis de FISH/ADN, o se expanden en cultivo y a continuación se someten a análisis de cariotipo (por ejemplo, mediante formación de bandas G).
- 30 En intentos de desarrollar un diagnóstico prenatal menos invasivo, diversos estudios han identificado marcadores que pueden detectar células fetales en el canal cervical (células transcervicales).
- 35 Las células transcervicales se pueden recuperar usando aspiración, citocepillo, torundas de lanolina, lavado endocervical o intrauterino y se pueden someter a análisis usando anticuerpos específicos de trofoblásticos tales como FT1.41.1, PLAP, NDOG-1, NDOG-5, mAb 340 y el anticuerpo de antígeno leucocitario humano (HLA-G).
- 40 La Publicación de PCT N.º WO2006/018849 desvela métodos de diagnóstico prenatal realizados en células transcervicales usando los anticuerpos HLA-G, PLAP, CHL1 y/o NDOG-1 seguido de análisis de FISH.
- 45 También se ha intentado diagnóstico prenatal no invasivo usando la sangre materna. Aunque es raro (por ejemplo, una célula fetal por millón de células nucleadas de sangre materna), en la sangre materna se encontraron trofoblastos fetales, leucocitos y eritrocitos nucleados durante el primer trimestre del embarazo. Sin embargo, el aislamiento de trofoblastos y leucocitos de la sangre materna se ve limitado por la disponibilidad de anticuerpos específicos del feto. Además, algunos estudios han demostrado que al menos un 50 % de los glóbulos rojos nucleados (NRBC) aislados de la sangre materna son de origen materno y además, ciertos tipos de células tienden a persistir en la circulación materna y por lo tanto a interferir potencialmente con el diagnóstico de los embarazos posteriores (Bianchi D 1996, Troeger C, *et al.*, 1999; Guetta *et al.*, 2004).
- 50 Los trofoblastos presentan un tipo de célula diana atractiva para diagnóstico prenatal no invasivo ya que se pueden aislar de una muestra de sangre materna al comienzo del primer trimestre, se pueden distinguir de las células sanguíneas maternas debido a su estructura única y están ausentes en la sangre de un adulto normal.
- 55 Los trofoblastos se han aislado de la sangre materna con varios métodos diferentes relacionados con la expresión del antígeno de superficie (por ejemplo, HLA-G) y tamaño celular (van Wijk *et al.*, 2001; Vona *et al.*, 2002). Además, los presentes inventores han demostrado el potencial de trofoblastos aislados de la sangre materna para proliferar *in vitro* en condiciones adecuadas (Guetta, *et al.*, 2005). Sin embargo, dado que HLA-G no se expresa de forma exclusiva en trofoblastos (Kirszenbaum M *et al.*, 1995) su uso para la detección de trofoblastos en la sangre materna es limitado.
- 60 Se descubrió que las citoqueratinas 7 y 8 (CK-7 y CK-8) se expresaban en tejidos y en células (Maldonado-Estrada, J., *et al.*, 2004; Yamamoto R, *et al.*, 1990; Tamai Y., *et al.*, 2000). Además, el nivel de expresión de la citoqueratina-19 (CK-19) en el suero a lo largo del tercer trimestre estaba asociado con preeclampsia grave (Tempfer CB., *et al.*, 2000).
- 65

Alguna técnica de antecedentes adicionales incluye Masuda J., *et al.*, 2004; Daya, D. y Sabet, L. 1991; Oudejans CB, *et al.*, 2003.

5 El documento WO 9006509 se refiere a un método para el aislamiento de células de trofoblastos (placentarias) de la sangre de un mamífero en gestación para proporcionar el material de partida esencial, es decir, células derivadas del feto, para poder obtener información genética y/o bioquímica del feto.

10 El documento EP1154016 se refiere a métodos para aislar células de trofoblastos de mujeres embarazadas. Se obtiene una muestra de sangre materna central, por lo general de la pared del útero de una mujer embarazada. Las células de trofoblastos se aíslan de la muestra de sangre materna central.

15 El análisis de microsátélites proporciona una confirmación eficaz de aislamiento de trofoblastos fetales de la circulación materna: "microsatellite analysis provides efficient confirmation of fetal trophoblast isolation from maternal circulation" prenatal diagnosis, Chichester, Sussex, gb lnkd- doi:10.1002/pd.103, vol. 21, 1 de enero de 2001 páginas 566-570.

MASUDA JUNKO *ET AL.*, desvela "Levels of annexin IV and V in the plasma of pregnant and postpartum women" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 91, n.º 6, junio de 2004), páginas 1129-1136.

20 ELDERING J A *ET AL.*, describe: "Presence of lipocortins I and IV, but not II and VI, in human platelets" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/0014-5793 (93) 80518-Y, vol. 318, n.º 3, 8 de marzo de 1993 páginas 231-234.

25 El documento US 5858649 enseña que las células fetales se pueden obtener a partir de amniocentesis, toma de muestras de vellosidades coriónicas, toma de muestras percutánea de cordón umbilical o fertilización *in vitro* de embriones o productos de la concepción, pero son preferentemente de sangre periférica materna. Las células fetales se pueden enriquecer mediante centrifugación en gradiente de densidad.

30 El documento US 2005124003 se refiere a células madre fetales pluripotentes derivadas de vellosidades coriónicas, líquido amniótico y placenta y los métodos para aislar, expandir y diferenciar estas células, y sus usos terapéuticos, tales como manipulación de las células madre fetales mediante transfección genética y otros medios para aplicaciones terapéuticas.

35 El documento US 2005049793 se refiere a un nuevo método de diagnóstico prenatal no invasivo implementado con una muestra de sangre materna. Dicho método permite el diagnóstico prenatal en células fetales epiteliales no apoptóticas aisladas de sangre materna después de haberlas enriquecido por filtración, y analizado de forma morfológica o de forma inmunológica y de forma genética. Dicho método es ventajoso por que es totalmente inofensivo para la madre y el feto y proporciona un diagnóstico altamente sensible y específico. Este permite la detección temprana de una anomalía genética o cromosómica del feto, de una patología genética o infecciosa (vírica, bacteriana o parasitaria) del feto, de genotipo exacto, y en particular del sexo genético del feto.

El documento US 2006040305 se refiere a un método sin riesgos, no invasivo de diagnóstico prenatal.

45 BLASHITZ *ET AL.*, se refiere a 'Antibody Reaction Patterns in First Trimester Placenta: Implications for Trophoblast Isolation and Purity Screening Placenta' PLANENTA vol. 21, 2000, páginas 733 - 741.

KING *ET AL.*, se refiere a 'Cell Culture Modets of Trophoblast II: Trophoblast Cell Lines A Workshop Report Placenta' TROPHOBLAST RESEARCH vol. 21, n.º SUP. A, 2000, páginas S113 - S119.

50 HAWES CATHERINE S *ET AL.*, se refiere a "A morfologic study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 170, n.º 5 PARTE 1, 1994, páginas 1297-1300. C Sjölin *ET AL.*, se refiere a "Calcium-induced translocation of annexins to subcellular organelles of human neutrophils", The Biochemical journal, 1 de junio de 1994 (1994-06-01), páginas 325-330, ENGLAND Obtenido de Internet: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8002935>.

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para identificar un trofoblasto, método que comprende

60 (a) detectar, en células nucleadas separadas de plasma y glóbulos rojos no nucleados de una muestra de sangre materna sometida a un gradiente de densidad, la expresión de un marcador de trofoblastos, en el que dicho marcador de trofoblastos es anexina IV de superficie celular y en el que dicha detección se lleva a cabo usando un anticuerpo anti-anexina IV; y

(b) clasificar como trofoblastos células nucleadas que presentan expresión de dicho marcador de trofoblastos;

65 identificando de ese modo el trofoblasto.

La presente invención también se refiere a un método *ex vivo* para aislar un trofoblasto de una muestra de sangre materna, que comprende:

- 5 (a) identificar el trofoblasto en la muestra de sangre materna de acuerdo con el método de la reivindicación 1, y  
(b) aislar el trofoblasto,

aislando de ese modo el trofoblasto de la muestra de sangre materna.

10 Preferentemente, el método comprende adicionalmente someter dicha muestra de sangre materna a una etapa de centrifugación en gradiente de densidad antes de la etapa (a).

15 La presente invención también se refiere a un método para someter a ensayo un embarazo en un sujeto, que comprende identificar, en una muestra de sangre materna el sujeto, un trofoblasto de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que una presencia de dicho trofoblasto en dicha muestra de sangre materna es indicativo del embarazo en el sujeto.

La presente invención también se refiere a un método *ex vivo* para diagnóstico prenatal de un feto, que comprende

- 20 (a) identificar, en una muestra de sangre materna de una mujer embarazada, un trofoblasto de acuerdo con el método de la reivindicación 1, y;  
(b) someter dicho trofoblasto a un ensayo de diagnóstico del producto de la concepción,

haciendo de ese modo un diagnóstico prenatal del producto de la concepción.

25 Preferentemente, el método de diagnóstico prenatal comprende adicionalmente cultivar dicho trofoblasto antes de la etapa (b) en condiciones adecuadas para proliferación de dicho trofoblasto.

La presente invención también se refiere a un método *ex vivo* para generar un cultivo de trofoblastos, que comprende

- 30 (a) aislar trofoblastos de acuerdo con el método de la reivindicación 2, y  
(b) cultivar dichos trofoblastos en condiciones adecuadas para proliferación de dichos trofoblastos,

35 generando de ese modo el cultivo de trofoblastos.

Preferentemente, el aislamiento de dicho trofoblasto se lleva a cabo mediante separación magnética de células (MACS) o separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

40 Preferentemente, el ensayo de diagnóstico del producto de la concepción se lleva a cabo mediante un análisis seleccionado entre el grupo que consiste en un análisis cromosómico, un análisis de cariotipo y un análisis de ADN. Preferentemente, el análisis cromosómico se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), etiquetado *in situ* con cebado (PRINS), formación de bandas multicolores (MCB) y/o FISH cuantitativa (Q-FISH).

45 Preferentemente, el análisis de cariotipo se lleva a cabo usando un método de tinción seleccionado entre el grupo que consiste en formación de bandas G, formación de bandas R, formación de bandas Q y formación de bandas C.

Preferentemente, el análisis de ADN comprende hibridación comparativa del genoma (CGH) y/o identificación de al menos una sustitución de ácido nucleico.

50 Preferentemente, la CGH se lleva a cabo usando cromosomas en metafase y/o una matriz de CGH.

Preferentemente, el diagnóstico del producto de la concepción comprende identificar al menos un cromosoma y/o anomalía de ADN, y/o determinación de una paternidad del producto de la concepción. Preferentemente, el método para identificar un trofoblasto comprende adicionalmente la detección de la expresión de citoqueratina-7.

55 Preferentemente el método para identificar un trofoblasto comprende adicionalmente la detección de la expresión de citoqueratina-7, citoqueratina-8 y citoqueratina-19.

Breve descripción de las figuras

60 En el presente documento, algunas realizaciones de la invención se describen, solamente a modo de ejemplo, con preferencia a las figuras adjuntas. Con referencia específica ahora a las figuras con detalle, se hace hincapié en que los datos mostrados son a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con las figuras hace evidente para los expertos en la materia cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

65

En las figuras:

La FIG. 1 es una imagen que representa análisis proteómico basada en electroforesis en gel de dos dimensiones que compara proteínas expresadas en trofoblastos de placenta (puntos de color violeta) con las expresadas en células de sangre materna (puntos de color verde).

Las FIGs. 2a-1 son imágenes que representan tinción con inmunofluorescencia de las líneas celulares de trofoblastos, JAR (N.º HTB-144 de la ATCC; Figuras 2a, d, g, j) y BeWo (N.º CCL-98 de la ATCC; Figuras 2b, e, h, k) y el tejido de placenta de un embarazo en el primer trimestre (Figuras 2c, f, i, l) usando anticuerpos monoclonales dirigidos frente al marcador de trofoblastos revelado mediante el análisis proteómico: CK-7 (citoqueratina-7; Figuras 2a-c), CK-8 (citoqueratina 8; Figuras 2d-f), CK-19 (citoqueratina-19; Figuras 2g-i), y Anexina IV (Figuras 2j-l). Obsérvese que las citoqueratinas 7, 8 y 19 se expresaban fuertemente en secciones de placenta así como en las líneas de células de trofoblastos, mientras que la Anexina IV también se expresaba en las 3 fuentes, sin embargo a intensidades más bajas.

La FIG. 3 es una imagen que representa tinción con inmunofluorescencia de células de sangre periférica materna enriquecidas mediante separación magnética de células (MACS) con el anticuerpo anti-anexina IV (sc-46693, Santa Cruz Biotechnology). La flecha apunta a una célula positiva para anexina-IV de un origen fetal con tinción fluorescente de color verde (FITC).

La FIG. 4 es una imagen que representa tinción con FISH de células de sangre materna enriquecidas con anti-anexina IV - MACS. Obsérvese que la célula en la parte superior es de un origen materno como se pone en evidencia con la presencia de dos señales de hibridación de color verde que corresponden a dos cromosomas X y la célula en la parte inferior es de un origen fetal ya que contiene una señal de color verde (del cromosoma X) y una señal de color naranja (del cromosoma Y).

Las FIGs. 5a-d son imágenes que representan análisis de inmunofluorescencia (Figuras 5a-c) y FISH (Figura 5d) de células de sangre periférica materna enriquecidas mediante separación magnética de células con anticuerpo anti-anexina IV. Obsérvese el etiquetado de color verde (FITC Verde) que resulta de la unión específica del anticuerpo anti-anexina IV, y el etiquetado de color azul (DAPI) de la contratinción nuclear (Figuras 5a-c). además, obsérvese las señales específicas de hibridación de FISH que resultan de la hibridación a las sondas de los cromosomas sexuales X (señal de color verde) e Y (señal de color naranja) (Figura 5d), que confirman el origen fetal de las células. Los aumentos del objetivo fueron X 40 (para las Figuras 5a-c) y X 100 (para la Figura 5d).

Las FIGs. 6a-b son imágenes que representan análisis de inmunofluorescencia (Figura 6a) y FISH (Figura 6b) de células de trofoblastos (trofoblastos de JAR) en experimentos de adición de células de sangre materna. Las células JAR que se tiñen de forma positiva con el anticuerpo anti-CK7 (FITC, Verde, Figura 6a, flecha) presentan un cariotipo poliploide como se pone en evidencia con análisis de FISH que revelaban la presencia de tres cromosomas X (tres señales de color verde) y un cromosoma Y (una señal de color naranja) (Figura 6b, flecha).

Las FIGs. 7a-b son imágenes que representan análisis de inmunofluorescencia (Figura 7a) y FISH (Figura 7b) de células de una muestra de sangre materna procesadas con un nuevo protocolo de MACS desarrollado por los presentes inventores para uso con un marcador intracelular (CK7). Figura 7a. Tinción de inmunofluorescencia de una célula fetal positiva para CK7 (flecha) que presenta tinción citoplasmática con FITC de color verde. La contratinción nuclear se realizó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células negativas para CK-7 (células de sangre materna) se tiñen solamente con tinción nuclear con DAPI de color azul. Figura 7b - el análisis de FISH confirma la presencia de una célula masculina (de un feto masculino, flecha) por la presencia de un cromosoma X (señal de color verde) y un cromosoma Y (señal de color rojo). El resto de las células (células de sangre materna) presentan dos señales de color verde (cromosomas XX).

La FIG. 8 es un histograma que representa el número medio de trofoblastos por una muestra de sangre de 20 ml aislada usando MACS basada en anexina IV (n = 20) o HLA-G (n = 13). Obsérvese el aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del rendimiento de las células fetales (trofoblastos) usando el análisis de MACS basado en anexina-IV (6,25 trofoblastos por una muestra de sangre de 20 ml) en comparación con el MACS basado en HLA-G (solamente 1,5 trofoblastos por una muestra de sangre de 20 ml).

La FIG. 9 es una imagen que representa inmunofluorescencia de trofoblastos enriquecidos a partir de sangre materna usando un anticuerpo anti HLA-G. Se muestran 2 células de trofoblasto (flechas I y II), teñidas de forma positiva con el anticuerpo HLA-G (tinción citoplasmática con fluorescencia de color verde) con una cromatina (tinción con DAPI de color azul) visiblemente organizada en la placa de metafase. Las células circundantes pequeñas son linfocitos maternos, con tinción positiva solamente con DAPI.

#### 55 Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos para identificar trofoblastos en una muestra biológica que es una muestra de sangre materna y, de forma más particular, pero no de forma exclusiva, a la utilización de los mismos para diagnóstico prenatal.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, se debe entender que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o realizados a modo de ejemplo con los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de su práctica o realización de varias maneras.

A la vez que la invención se reduce a la práctica, los presentes inventores han descubierto un método para identificar un trofoblasto en una muestra biológica.

Por lo tanto, como se muestra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, usando análisis de proteómica comparativa, los presentes inventores han identificado proteínas que se expresan altamente en trofoblastos de la placenta pero no en células de sangre periférica (Figuras 1, 2a-1, Ejemplo 1) y que se pueden usar para un diagnóstico prenatal no invasivo. Estas proteínas incluyen citoqueratina 7 (N.º de Registro en GenBank NP\_005547; SEC ID N.º: 1), citoqueratina 8 (N.º de Registro en GenBank NP\_002264; SEC ID N.º: 2), citoqueratina 19 (N.º de Registro en GenBank NP\_002267; SEC ID N.º: 3) y anexina IV (N.º de Registro en GenBank NP\_001144; SEC ID N.º: 7). Además, como se describe en los Ejemplos 2-4 de la sección de Ejemplos que sigue a continuación, los presentes inventores demostraron el enriquecimiento de separación magnética de células (MACS) de trofoblastos de muestras de sangre periférica materna usando anticuerpos específicos para el marcador de trofoblastos de anexina IV o CK-7 (Figuras 3, 4, 5a-d, 6a-b, 7a-b) que era mucho más eficaz que el enriquecimiento de MACS basado en HLA-G (Figura 8, Ejemplo 5). Los trofoblastos se analizaron adicionalmente mediante tinción con FISH para detectar aberraciones cromosómicas (Figuras 4, 5a-d, 6a-b, 7a-b) del feto. Además, se mostró que los trofoblastos aislados de la sangre materna eran capaces de proliferar en cultivo (Guetta 2005; Figura 9 y Ejemplo 6 en el presente documento a continuación). Por lo tanto, estos resultados demuestran un nuevo método para identificar trofoblastos de una muestra biológica tal como la sangre materna que se puede usar para diagnóstico prenatal, ya sea directamente o en trofoblastos cultivados.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un trofoblasto de acuerdo con la reivindicación 1.

Como se usa en el presente documento, el término "trofoblasto" se refiere a una célula epitelial (ya sea viable o no) que se deriva de la placenta de un embrión o feto de mamífero; por lo general un trofoblasto está en contacto con la pared uterina. Hay tres tipos de células de trofoblasto en el tejido de la placenta: el citotrofoblasto vellosos, el sincitiotrofoblasto y el trofoblasto extraveloso, y como tal, el término "trofoblasto" como se usa en el presente documento incluye cualquiera de estas células. Las células de citotrofoblasto vellosos son células epiteliales especializadas de la placenta, que se diferencian, proliferan e invaden la pared uterina para formar las vellosidades. Los citotrofoblastos, que están presentes en las vellosidades de anclaje se pueden fusionar para formar la capa de sincitiotrofoblastos o para formar columnas de trofoblastos extravelosos (Cohen S. *et al.*, 2003. *J. Pathol.* 200: 47-52).

Como se usa en el presente documento, la expresión "identificación de un trofoblasto" se refiere a la identificación de una célula de trofoblasto y/o una muestra que contiene trofoblastos.

La muestra biológica usada por el método de este aspecto de la invención es una "muestra de sangre materna" es decir, una muestra de sangre obtenida de una hembra embarazada. En formas de realización a modo de ejemplo, la muestra biológica no es placenta.

La muestra biológica se puede obtener usando métodos invasivos o no invasivos, tal como se describe en lo sucesivo en el presente documento. La etapa de obtención de la muestra de sangre no forma parte de la invención.

Una muestra de sangre materna se puede obtener por extracción de sangre de un vaso de sangre periférica (por ejemplo, una vena periférica), o de cualquier otro vaso sanguíneo tal como la vena uterina (por ejemplo, como se describe en Kozma, R., *et al.*, *Human Reproduction*, 1: 335-336). La muestra de sangre puede tener aproximadamente 20-25 ml. La muestra de sangre periférica se obtiene durante el primer trimestre del embarazo (por ejemplo, entre las 6-13 semanas de gestación).

Una vez obtenida, la muestra de sangre se puede someter a una centrifugación en gradiente de densidad tal como los tubos Unisep Maxi (Novamed Jerusalén, Israel, tubos U16)] que separa células nucleares (la capa leucocítica) del plasma o los glóbulos rojos no nucleados. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, a partir de una muestra de sangre periférica de 20 ml se obtienen aproximadamente  $1-5 \times 10^7$  células nucleadas.

Las muestras biológicas transcervicales o intrauterinas se pueden obtener mediante aspiración de mucosidad (véase por ejemplo, Sherlock, J., *et al.*, 1997. *J. Med. Genet.* 34: 302-305; Miller, D. y Briggs, J. 1996. *Early Human Development* 47: S99-S102), citocepillo (véase por ejemplo, Cioni, R., *et al.*, 2003. *Prent. Diagn.* 23: 168-171; Fejgin, M.D., *et al.*, 2001. *Prenat. Diagn.* 21: 619-621), hisopo de lanolina (véase por ejemplo, Griffith-Jones, M.D., *et al.*, 1992. mencionado anteriormente), lavado endocervical (véase por ejemplo, Massari, A., *et al.*, 1996. *Hum. Genet.* 97: 150-155; Griffith-Jones, M.D., *et al.*, 1992. mencionado anteriormente; Schueler, P.A. *et al.*, 2001. 22: 688-701), y lavado intrauterino (véase por ejemplo, Cioni, R., *et al.*, 2002. *Prent. Diagn.* 22: 52-55; Ishai, D., *et al.*, 1995. *Prenat. Diagn.* 15: 961-965; Chang, S-D., *et al.*, 1997. *Prenat. Diagn.* 17: 1019-1025; Sherlock, J., *et al.*, 1997, mencionado anteriormente; Bussani, C., *et al.*, 2002. *Prenat. Diagn.* 22: 1098-1101).

Una muestra biológica transcervical se puede obtener entre la 3ª y la 15ª semana de gestación.

Una muestra de amniocitos se puede obtener mediante amniocentesis que normalmente se lleva a cabo entre la 14ª y la 22ª semana de gestación por inserción de una aguja fina a través del abdomen en el útero. Por ejemplo, se puede retirar una muestra de aproximadamente 20-30 ml de líquido amniótico.

5 Se debería observar que una vez obtenida, la muestra biológica se puede procesar adicionalmente [por ejemplo, someter a centrifugación, etiquetado, lisis celular, extracción de macromoléculas (por ejemplo, polinucleótidos y polipéptidos)] dependiendo del método posterior de detección de trofoblastos como se describe en lo sucesivo en el presente documento.

10 Como se ha mencionado, la identificación de un trofoblasto de acuerdo con este aspecto de la invención se lleva a cabo mediante detección de la expresión del marcador de trofoblastos, anexina IV, en un método de acuerdo con la reivindicación 1. Además se puede detectar citoqueratina-7, citoqueratina-8 y citoqueratina-19.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión de un marcador de trofoblastos" se refiere a la presencia y/o nivel del producto genético (es decir, ARN o proteína) del marcador de trofoblastos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "anexina IV" se refiere al producto genético de la secuencia genómica de la Anexina IV formada por los nucleótidos 69862156-69907095 con el N.º de Registro en GenBank NC\_000002.10, tal como la secuencia de ARNm establecida en la SEC ID N.º: 11 (N.º de Registro en GenBank NM\_001153.3) y la secuencia de polipéptidos establecida en la SEC ID N.º: 7 (N.º de Registro en GenBank NP\_001144.1; CCDS1894.1).

25 Como se usa en el presente documento, el término "citoqueratina-7" se refiere al producto genético de la secuencia genómica de la citoqueratina-7 formada por los nucleótidos 50913221-50928976 con el N.º de Registro en GenBank NC\_000012.10, tal como la secuencia de ARNm establecida en la SEC ID N.º: 8 (N.º de Registro en GenBank NM\_005556.3) y la secuencia de polipéptidos establecida en la SEC ID N.º: 1 (N.º de Registro en GenBank NP\_005547.3; CCDS8822.1).

30 Como se usa en el presente documento, el término "citoqueratina-8" se refiere al producto genético de la secuencia genómica de la citoqueratina-8 formada por los nucleótidos 51577238-51585127 con el N.º de Registro en GenBank NC\_000012.10, tal como la secuencia de ARNm establecida en la SEC ID N.º: 9 (N.º de Registro en GenBank NM\_002273.2) y la secuencia de polipéptidos establecida en la SEC ID N.º: 2 (N.º de Registro en GenBank NP\_002264.1; CCDS8841.1).

35 Como se usa en el presente documento, el término "citoqueratina-19" se refiere al producto genético de la secuencia genómica de la citoqueratina-19 formada por los nucleótidos 36933395-36938167 con el N.º de Registro en GenBank NC\_000017.9, tal como la secuencia de ARNm establecida en la SEC ID N.º: 10 (N.º de Registro en GenBank NM\_002276.4) y la secuencia de polipéptidos establecida en la SEC ID N.º: 3 (N.º de Registro en GenBank NP\_002267.2; CCDS11399.1).

40 La detección de la presencia y/o nivel del marcador de trofoblastos de ARN se puede llevar a cabo usando un método de detección de ARN tal como análisis de transferencia de Northern [por ejemplo, usando una sonda de ADN o ARN etiquetada que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria con al menos una parte de la secuencia de ácidos nucleicos del marcador de trofoblastos de ARN (por ejemplo, SEC ID N.ºs: 8-11) y detectando la sonda unida usando autorradiografía, una reacción colorimétrica, o quimioluminiscencia, dependiendo del tipo de etiqueta usada], análisis de RT-PCR [que detecta la presencia de una secuencia de ARN específica usando cebadores de PCR específicos], RT-PCR semicuantitativa [que compara el nivel de expresión relativa de un ARN específico entre diferentes muestras, mediante el ajuste del número de ciclos de PCR de acuerdo con muestras de referencia conocidas], RT-PCR en tiempo real [que permite tanto detección como cuantificación (como número absoluto de copias o cantidad relativa cuando se normaliza con respecto a una aportación de ARN) de una secuencia de ARN específica], hibridación de ARN *in situ* [que permite la detección y localización de moléculas de ARN específicas dentro de una célula], tinción con RT-PCR *in situ* [que se lleva a cabo sobre células fijadas usando un aparato tal como el sistema de Microdissección de Captura Láser (LCM) PixCell II™ para microdissección con capturar láser disponible en Arcturus Engineering (Mountainview, California, USA), o PALM, Alemania] como se describe en Nuovo, G. J. *et al.*, (1993) *Am J Surg Pathol* 17, 683-690; y Komminoth, P. *et al.*, (1994) *Pathol Res Pract* 190, 1017-1025]] y micromatriz de oligonucleótidos [por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos (por ejemplo, con una longitud de 20-25 ácidos nucleicos, capaces de hibridarse de forma específica al ARN de interés) que se unen a una superficie sólida (por ejemplo, una oblea de vidrio) tal como la Micromatriz Affymetrix® GeneChip® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California, USA)].

60 Algunos ejemplos no limitantes de sondas de ADN complementario (que están en la dirección antisentido con respecto a la secuencia sentido del ARNm) que se pueden usar para la detección de ARN de anexina IV, citoqueratina-7, citoqueratina-8 o citoqueratina-19 mediante transferencia de Northern o hibridación de ARN *in situ* se proporcionan en las SEC ID N.ºs: 12, 13, 14 o 15, respectivamente. Algunas directrices y herramientas para diseñar sondas para hibridación de ARN *in situ* o hibridación por transferencia de Northern se describen en Brain

65

Research Protocols, 4: 82-91, 1999; y en Hyper Text Transfer Protocol://World Wide Web (dot) anst (dot) uu (dot) se/vigie517/ishprobe (dot) htm.

Las sondas de polinucleótido adecuadas se pueden hibridar de forma específica con sus secuencias de ARNm diana (por ejemplo, se pueden hibridar al ARN del marcador de trofoblastos pero no a otras secuencias de ARN en la muestra). A modo de ejemplo, la hibridación de sondas de polinucleótido corto (con una longitud inferior a 200 nucleótidos) se puede llevar a cabo con los siguientes protocolos de hibridación dependiendo de la rigurosidad deseada; (i) una solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACI 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche seca desnatada al 0,1 %, temperatura de hibridación de 1 - 1,5 °C por debajo de la  $T_m$ , solución de lavado final de TMACI 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1 - 1,5 °C por debajo de la  $T_m$ ; (ii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 0,1 % o TMACI 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche seca desnatada al 0,1 %, temperatura de hibridación de 2 - 2,5 °C por debajo de la  $T_m$ , solución de lavado final de TMACI 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1 - 1,5 °C por debajo de la  $T_m$ , solución de lavado final de 6 x SSC, y lavado final a 22 °C; (iii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACI 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche seca desnatada al 0,1 %, temperatura de hibridación de 37 °C, solución de lavado final de 6 x SSC y lavado final a 22 °C. Un experto en la materia puede realizar variaciones en las condiciones de hibridación (por ejemplo, solución de hibridación, soluciones de lavado y temperaturas) de acuerdo con la longitud de la sonda y su contenido de G/C. Por ejemplo, para sondas de polinucleótido con más de 200 nucleótidos, las temperaturas de hibridación/lavados pueden ser de aproximadamente 55-80 °C (por ejemplo, 65 °C) y las soluciones de hibridación/lavado pueden incluir formamida (por ejemplo, 50 %).

Algunos ejemplos no limitantes de pares de cebadores de RT-PCR que se pueden usar para la detección de ARN de anexina IV, citoqueratina-7, citoqueratina-8 o citoqueratina-19 mediante RT-PCR se proporcionan en las SEC ID N<sup>os</sup>: 16-17, 18-19, 20-21 o 22-23, respectivamente.

La detección de la presencia y/o nivel de marcador de trofoblastos de proteína, anexina-IV, de la invención se puede llevar a cabo usando un método de detección de proteínas usando anticuerpos específicos para el marcador de trofoblastos de proteína (por ejemplo, SEC ID N<sup>o</sup>: 7, véanse, por ejemplo, los anticuerpos que se describen en la sección de Ejemplos que sigue a continuación) con análisis de transferencia de Western, ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoensayo (RIA), o *in situ* con inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o tinción de actividad que puede ir seguido de contratinción de núcleos celulares, usando, por ejemplo, tinción con Hematoxilina, Giemsa, o DAPI.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o moléculas de un solo dominio tales como VH y VL para un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como sigue a continuación: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir por digestión de todo el anticuerpo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta una parte de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener por tratamiento de todo el anticuerpo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; por molécula de anticuerpo se obtienen dos fragmentos de Fab'; (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener por tratamiento de todo el anticuerpo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos de Fab' mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado con ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; (5) anticuerpo de una sola cadena ("SCA"), una molécula modificada con ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un conector polipeptídico adecuado como una molécula de una sola cadena genéticamente fusionada; y (6) los anticuerpos de un solo dominio están formados por dominios individuales de VH o VL que presentan una afinidad suficiente con respecto al antígeno.

En la técnica se conocen bien algunos métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales así como fragmentos de los mismos (véase por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988); Goldenberg, Pat. de Estados Unidos N.º 4.036.945 y 4.331.647, y referencias contenidas en las mismas; Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]; Inbar *et al.* [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659-62 (1972)]; Whitlow y Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988); Pack *et al.*, Bio/Technology 11: 1271-77 (1993); y Pat. de Estados Unidos N.º 4.946.778; Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

Otra forma de fragmentos de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región que determina la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") se pueden obtener mediante construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células que



producen anticuerpos. Véase, por ejemplo Larrick, J. W. y Fry, K. E. (1991). PCR Amplification of Antibody Genes. METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2 (2), 106-110.

El anticuerpo usado por el método de la divulgación se puede conjugar directamente a una etiqueta [por ejemplo, una etiqueta fluorescente tal como fluoresceína (FITC), Rojo Texas, rodamina, o un isótopo radiactivo, por ejemplo, <sup>131</sup>I], un miembro de un par de afinidad (por ejemplo, biotina o digoxigenina (DIG) que se puede unir a estreptavidina o un anticuerpo de DIG, respectivamente) o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa).

Algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos que se pueden usar para detectar el marcador de trofoblastos de proteína de la divulgación incluyen anticuerpos anti-anexina IV [por ejemplo, clon D2 de ratón anti-anexina IV (sc-46693, Santa cruz Biotechnology)], anticuerpos anti-citoqueratina-7 [por ejemplo, clon OV-TL12/30 de citoqueratina-7 de ratón anti-humano (M701801, Dako); anti Citoqueratina 7 de IgG1 de ratón (Santa cruce, por ejemplo, sc-70934, sc-70933, sc-70935, sc-51585, sc-65214, sc-53263, sc-52322, sc-23876; GeneTex, inc GTX72603, GTX23973, GTX17138, GTX40206, GTX17069, GTX29021, GTX23973, GTX23973; NOVUS NB-100-2777, NOVUS NB500-322), anti-Citoqueratina 7 de IgG2b de ratón (Santa cruce por ejemplo, sc-53264)], anticuerpos anti-citoqueratina-8 [por ejemplo, clon LP3K de citoqueratina 8 de ratón anti-humano (0200-0618, Serotec); anti-Citoqueratina 8 de IgG2a de ratón (Santa cruce sc-58736), anti-Citoqueratina 8 de IgG1 de ratón (Santa cruce sc-70937, sc-58740, sc-8020; GeneTex, inc GTX22530, GTX22531, GTX40207, GTX29023; NOVUS NB100, Southern Biotech 10080-01), anti-Citoqueratina 8 de IgG2a de ratón (Santa cruce sc-73480), anti-Citoqueratina 8 de IgM de ratón (Santa cruce sc-58737; GeneTex, inc GTX27506, GTX20758)] y anticuerpos anti-citoqueratina-19 [por ejemplo, clon RCK 108 (M0888, Dako); anti-Citoqueratina 19 de IgG1 de ratón (Santa cruce sc-6278, sc-51584, sc-53257, sc-53258, sc-53003; NOVUS NB-500-358, NB100-2781), anti-Citoqueratina 19 de IgG2a (GeneTex, inc. GTX73588, GTX27754, GTX28804; BioLegend 628501/2, SEROTEC 5552-9009, Southern Biotech 10090-01), anti-Citoqueratina 19 de IgG1 (GeneTex, inc. GTX73697, GTX27755, GTX40210, GTX29221)].

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra biológica se procesa de acuerdo con el método utilizado para identificar trofoblastos. Por ejemplo, para detección *in situ* del marcador de trofoblastos usando métodos de detección de proteínas (por ejemplo, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia) o de ARN (por ejemplo, RT-PCR *in situ*, hibridación de ARN *in situ*), las células nucleadas de la muestra biológica se pueden colocar en un portaobjetos de microscopio usando por ejemplo, una citocentrífuga [por ejemplo, Cytofunnel Chamber Cytocentrifuge (Thermo-Shandon, Inglaterra)]. Se debería indicar que las condiciones usadas para la citocentrifugación dependen de la turbidez de la muestra biológica; si la muestra de ensayo contiene solamente unas pocas células, las células se centrifugan con primero durante 5 minutos y a continuación se suspenden con un volumen pequeño (por ejemplo, 1 ml) del medio recién preparado o PBS. Una vez preparadas, los portaobjetos de Cytospin se pueden mantener en alcohol al 95 % hasta su uso adicional.

Para métodos de detección de ARN tales como transferencia de Northern, RT-PCR, micromatriz de oligonucleótidos, o métodos de detección de proteínas tales como transferencia de Western, RIA o ELISA, las células nucleadas de la muestra biológica se someten a lisis celular seguido de extracción de las moléculas de ARN o proteína.

Para análisis de FACS, las células nucleadas de la muestra biológica se etiquetan con los anticuerpos apropiados y se cargan en una máquina de FACS. Se debería indicar que cuando se usan anticuerpos dirigidos frente a antígenos internos (por ejemplo, proteínas intracelulares tales como citoqueratina-7, 8 o 19), las células nucleadas de la muestra biológica se pueden permeabilizar primero usando por ejemplo, una solución que incluye saponina.

La clasificación de trofoblastos o muestras que contienen trofoblastos puede ser cualitativa y/o cuantitativa y se puede llevar a cabo de forma manual o de forma automática usando por ejemplo, un aparato/software de análisis de imágenes. Por ejemplo, la posición de una cierta célula (que se clasifica como un trofoblasto) en una muestra de ensayo se puede marcar usando métodos conocidos, tales como mediante marcado del propio portaobjetos del microscopio (por ejemplo, en la superficie posterior que no contiene células), o usando coordinados celulares tal como se determina usando un microscopio y/o un aparato de análisis de imagen. Algunos ejemplos no limitantes de aparatos de análisis de imágenes incluyen el aparato de análisis de imágenes BioView Duet™ (Bio View Ltd. Rehovot, Israel) y el Sistema Aplicado de Formación de Imágenes (Newcastle, Inglaterra).

La presente divulgación concibe el uso del marcador de trofoblastos identificado (es decir, una anexina IV, una citoqueratina-7, una citoqueratina-8 y/o una citoqueratina-19) para determinar un embarazo en un sujeto.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método para someter a ensayo un embarazo en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 4. El método se lleva a cabo mediante identificación, en una muestra biológica del sujeto, de un trofoblasto de acuerdo con las enseñanzas que se han descrito anteriormente, en el que una presencia del trofoblasto en la muestra biológica es indicativa del embarazo del sujeto.

La muestra biológica usada de acuerdo con este aspecto de la invención es una muestra de sangre materna.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la presencia del marcador de trofoblastos de proteína, anexina-IV, por encima de un umbral determinado previamente es indicativo del embarazo del sujeto. El umbral

determinado previamente se puede determinar de acuerdo con muestras de referencia obtenidas de sujetos de control no embarazados.

5 Una vez identificado, el trofoblasto se puede aislar adicionalmente a partir de la muestra biológica. Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para aislar un trofoblasto de una muestra de sangre materna de acuerdo con la reivindicación 2. El método se lleva a cabo mediante identificación del trofoblasto en la muestra biológica de acuerdo con las enseñanzas que se han descrito anteriormente y aislando el trofoblasto, aislando de ese modo el trofoblasto de la muestra biológica.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "aislamiento de un trofoblasto" se refiere al aislamiento físico de una célula de trofoblasto de una población heterogénea de células (por ejemplo, las otras células dentro la muestra biológica que contiene trofoblastos).

15 El aislamiento físico de un trofoblasto se puede llevar a cabo usando métodos que implican la formación de inmunocomplejos entre la célula de trofoblasto y anticuerpo (o anticuerpos; por ejemplo, una combinación de anti-anexina IV y anti-citoqueratina-7) que se pueden unir de forma específica a un antígeno(s) expresado sobre o en la célula. Como alternativa, el aislamiento físico de una célula de trofoblasto se puede llevar a cabo diseccionando el trofoblasto identificado de una muestra de ensayo que contiene al mismo (por ejemplo, usando microdissección de captura con láser).

20 De acuerdo con la invención, el aislamiento del trofoblasto se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra de sangre materna que contiene trofoblastos (identificada como se ha descrito anteriormente en el presente documento) con un anticuerpo dirigido frente a la anexina IV en condiciones que permiten la formación de inmunocomplejos entre el anticuerpo y el trofoblasto, y aislando el inmunocomplejo de la muestra biológica.

25 Las células de la muestra biológica que contienen trofoblastos que forman el inmunocomplejo con el anticuerpo pueden ser células cultivadas (como se describe adicionalmente a continuación) o no cultivadas. En algunas realizaciones, el contacto del anticuerpo se lleva a cabo en condiciones que mantienen la viabilidad de las células tal como para permitir la expansión de las mismas.

30 Los expertos en la materia conocen las condiciones que son suficientes para la formación de inmunocomplejo (por ejemplo, concentraciones, tampones, temperaturas, tiempos de reacción apropiados) así como métodos para optimizar las mismas, y en el presente documento se desvelan algunos ejemplos.

35 El inmunocomplejo se forma entre un anticuerpo y el antígeno de superficie celular, anexina IV.

Un inmunocomplejo se puede formar entre un anticuerpo y un antígeno intracelular (por ejemplo, citoqueratina-7, 8 o 19).

40 El inmunocomplejo se puede formar entre dos o más anticuerpos dirigidos frente a antígenos intracelulares y/o de la superficie celular.

45 El inmunocomplejo que se ha descrito anteriormente en el presente documento se puede aislar de la muestra biológica usando métodos conocidos tales como análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o separación magnética de células (MACS).

50 Para aislamiento por FACS, las células se etiquetan con el anticuerpo anti-trofoblasto que se puede etiquetar con fluorescencia (por ejemplo, FITC) para formar un inmunocomplejo etiquetado y la detección se lleva a cabo por medio de una máquina de separación celular que lee la longitud de onda de la luz emitida de cada célula a medida que pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear dos o más anticuerpos de forma simultánea. Como se ha mencionado, si el marcador de trofoblastos es un marcador interno, las células se pueden permeabilizar y el análisis de FACS se pueden realizar con anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden penetrar fácilmente en la célula y se pueden retirar de la célula fácilmente mediante lavado después de la detección. El proceso de FACS se puede repetir un número de veces utilizando los mismos marcadores u otros diferentes dependiendo del grado de enriquecimiento requerido.

55 Para aislamiento por MACS, el inmunocomplejo se puede poner en contacto con inmunoperlas, es decir, perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo capaz de unirse directa o indirectamente al inmunocomplejo formado entre el trofoblasto y el anticuerpo marcador anti-trofoblasto. Las inmunoperlas pueden ser perlas magnéticas (tales como los disponibles en Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Alemania; 130-048-402) acopladas con un anticuerpo secundario (que se une de forma específica al anticuerpo primario), o perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo terciario que se une el anticuerpo secundario tales como perlas magnéticas acopladas con anti-FITC (por ejemplo, Miltenyi Biotec, 130-048-701). Después de la adición de las inmunoperlas a la muestra biológica que contiene trofoblasto, se emplea un campo magnético (por ejemplo, usando las columnas Mini-Macs© disponibles en Miltenyi Biotec, 130-042-201) dando como resultado el aislamiento de células inmunopositivas junto con las inmunoperlas. Las inmunoperlas se someten adicionalmente a lavados intensos con el fin de minimizar la contaminación no trofoblástica. El

inmunocomplejo se puede separar de las inmunoperlas usando, por ejemplo, tampón de baja fuerza iónica (Scouten WH y Konecny P. Anal Biochem. 1992, 205: 313-8)]. Después del aislamiento, el inmunocomplejo se puede someter adicionalmente a una tinción inmunológica usando uno o más anticuerpos dirigidos frente al marcador o marcadores de trofoblastos descritos anteriormente.

5 Como se ha mencionado, el aislamiento físico de una célula de trofoblasto se puede llevar a cabo mediante microdissección por captura con láser.

10 La microdissección por captura con láser de células se usa para aislar de forma selectiva un tipo celular específico de una población heterogénea de células contenida en un portaobjetos. En la técnica se conocen algunos métodos de uso de microdissección por captura con láser (véase por ejemplo, Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 20030227611 de Fein, Howard *et al.*, Micke P, *et al.*, 2004. J. Pathol., 202: 130-8; Evans EA, *et al.*, 2003. Reprod. Biol. Endocrinol. 1: 54; Bauer M, *et al.* 2002. Paternity testing after pregnancy termination using laser microdissection of chorionic villi. Int. J. Legal Med. 116: 39-42; Fend, F. y Raffeld, M. 2000, J. Clin. Pathol. 53: 666-72).

15 Por ejemplo, una muestra de células que contiene trofoblastos (por ejemplo, un portaobjetos de citospina de células de sangre periférica materna) se pone en contacto con una superficie activada de forma selectiva [por ejemplo, una membrana termoplástica tal como una membrana de polietileno (portaobjetos de PEN; C. Zeiss, Thornwood, NY)] capaz de adherirse a una célula específica después de activación con láser. La muestra de células se somete a una tinción diferencial que identifica el trofoblasto dentro de la muestra celular [por ejemplo, un método de detección de proteínas tal como una tinción inmunológica, por ejemplo, inmunocitoquímica o inmunofluorescencia (usando, por ejemplo, un anticuerpo anti anexina IV, citoqueratina-7, 8 y/o 19) o un método de detección de ARN tal como hibridación de ARN *in situ*, RT-PCR *in situ* (con una sonda o cebadores de PCR específicos para el ARN de anexina IV, citoqueratina-7, 8 y/o 19)], tras lo cual, la muestra de células se visualiza usando un microscopio para identificar la célula de trofoblasto teñida de forma diferencial (es decir, una célula positiva para anexina IV, citoqueratina-7, 8 y / o 19) y un haz de láser dirigido a través de una fibra óptica [por ejemplo, usando el sistema PALM Microbeam (PALM Microlaser Technologies AG, Bernreid, Alemania)] activa la superficie que se adhiere a la célula de trofoblasto seleccionada. El haz de láser usa las regiones de rayos ultravioleta (UV, por ejemplo, 337 nm), el UV lejano (200-315 nm) y el UV cercano (315-400 nm) que son adecuadas para el aislamiento adicional de ADN, ARN o proteínas de la célula microdisseccionada. Después de la disección (es decir, el la separación por corte de la célula), el rayo láser expulsó por soplado la célula acortada en una tapa de recuperación de un microtubo, básicamente tal como se ilustra en Tachikawa T e Irie T, 2004, Med. Electron Microsc., 37: 82-88. Se debería indicar que para el análisis de ADN posterior, el ADN se puede extraer usando, por ejemplo, la lisis alcalina o los protocolos de proteinasa K que se describen en Rook M, *et al.*, 2004, Am. J. of Pathology, 164: 23-33.

35 Las presentes enseñanzas también permiten el diagnóstico prenatal de un producto de la concepción.  
Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de la concepción" se refiere a un embrión, un feto o una membrana extraembrionaria de un embarazo en curso.

40 El método para diagnóstico prenatal de un producto de la concepción se lleva a cabo de acuerdo con la reivindicación 5, mediante la identificación, en una muestra de sangre materna, de un trofoblasto y sometiendo el trofoblasto a un ensayo de diagnóstico del producto de la concepción.

45 Un ensayo de diagnóstico de producto de la concepción se puede llevar a cabo directamente en el trofoblasto (ya sea aislado de la muestra que contiene trofoblasto o no), o se puede llevar a cabo en células de trofoblasto cultivadas.

50 El ensayo de diagnóstico del producto de la concepción se puede llevar a cabo mediante un análisis cromosómico [es decir, un análisis realizado en cromosomas intactos (*in situ*, dentro de la célula) para determinar anomalías en un nivel de cromosoma] y/o mediante análisis de ADN [es decir, un análisis realizado en las moléculas de ADN de una célula o células, normalmente en moléculas de ADN aisladas derivadas de una célula o células para determinar la secuencia de ácidos nucleicos del ADN y/o para identificar cambios en las secuencias de ADN (en comparación con los controles normales), que se pueden relacionar con las enfermedades o polimorfismos genéticos].

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el análisis cromosómico se lleva a cabo mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH), etiquetado *in situ* con cebado (PRINS), formación de bandas multicolores (MCB) y/o FISH cuantitativa (Q-FISH).

60 En la técnica se conocen algunos métodos para usar análisis de FISH en cromosomas en interfase. Para la detección de anomalías numéricas, translocaciones, inversión, duplicaciones y supresiones en los cromosomas se pueden usar varias sondas disponibles en el mercado. Las sondas se mezclan con un tampón de hibridación (por ejemplo, LSI/WCP, Abbott) y un ADN vehículo (por ejemplo, ADN Cot 1 de humano, disponible en Abbott), aplicadas en porta objetos del microscopio que contienen muestras de ensayo de citospina de una muestra que contiene trofoblastos, se desnaturalizan e incuban para hibridación a aproximadamente 37 °C durante 4-60 horas (por ejemplo, 24-48 horas). Después de la hibridación, el exceso de sonda se retira por lavado, las células se contrañen

[por ejemplo, usando una contratinción de DAPI II (Abbott)] y los portaobjetos se dejan secar en la oscuridad. La detección de resultados de FISH se lleva a cabo usando un microscopio de fluorescencia, conectado opcionalmente a un aparato de análisis de imágenes (por ejemplo, un dispositivo de barrido automático). De forma análoga, FISH se puede emplear en cromosomas en metafase.

5 Algunos ejemplos no limitantes de sondas de FISH que se pueden usar con el método de la invención incluyen: sondas CEP de color verde para X y naranja para Y (de cat n.º 5J10-51 de Abbott), Sonda de Región de Microsupresión Vysis® 1p36 - LSI p58 (1p36) (SO)/TelVysion™ 1p (SG)/LSI 1q25 (SA); Sonda de Región de Cri-du-Chat - LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen™; Sonda de Región de Cri-du-Chat - LSI EGR1 SpectrumOrange/LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen™; Sonda de Región de DiGeorge - LSI N25 SpectrumOrange/ARSA SpectrumGreen; Sonda de Región de DiGeorge - LSI TUPLE 1 SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen; Sonda de Región de DiGeorge - Sonda de LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/TelVysion 22q SpectrumGreen; Sonda de Región de Kallman - LSI KAL SpectrumOrange/CEP® X SpectrumGreen; Sonda de Región de Miller-Dieker/Sonda de Lisencecefalia Aislada LSI LIS1 SpectrumOrange/LSI RARA SpectrumGreen; Sonda de Región de Prader-Willi/Angelman - LSI D15S10 SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen/PML SpectrumOrange™; Sonda de Región de Prader-Willi/Angelman - LSI D15S11 SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen; Sonda de Región de Prader-Willi/Angelman - LSI GABRB3 SpectrumOrange/CEP 15 (D15Z1) SpectrumGreen; Sonda de Región de Prader-Willi/Angelman - LSI SNRPN (SO)/CEP 15 (D15Z1) (SO)/LSI PML (SO); Sonda de Región de Smith-Magenis - LSI SMS Region SpectrumOrange/LSI RARA Spectrum-Green; Sonda de Región de Sotos - Sonda de LSI NSD1 (5q35) SpectrumOrange™; Sonda de SRY LSI SRY Spectrum Orange/CEP X Spectrum Green; Sonda de SRY - LSI SRY Spectrum Orange; Sonda de Deficiencia de Sulfatasa Esteroidea - LSI STS SpectrumOrange/LSI CEP X SpectrumGreen; Sonda de Región de Williams - LSI ELN SpectrumOrange/LSI D7S486, D7S522 SpectrumGreen; Sonda de Región de Wolf-Hirschhorn - LSI WHS SpectrumOrange/CEP 4 SpectrumGreen; Vysis LSI 13 (RB1) 13q14 SpectrumOrange™; Vysis LSI 13 (13q14) SpectrumGreen 32-192018, 05J14-018; Vysis LSI 21 SpectrumOrange 32-190002, 05J13-002; Vysis LSI 22 (BCR) SpectrumGreen 32-192024, 05J17-024; FISH de 5 colores en una sola célula: Sonda Multicolor Vysis MultiVysion PB, 32-131085, 05J31-085; Sonda Multicolor Vysis MultiVysion PGT, 32-131080, 05J32-080; Sonda Vysis ToTelVysion 33-270000, 05J05-001; Sonda de telómero tales como las sondas Vysis ToTelVysion 33-270000, 05J05-001 y Telvysion; FISH de 5 sondas para análisis de aneuploidía de los cromosomas 13, 18, 21, X, Y (se puede llevar a cabo en cromosomas en interfase o metafase); FISH de múltiples colores tal como el uso de las sondas SKY de formación de cariotipos espectrales (Applied Spectral Imaging, Migdal Haemek; N.º de Cat. SKY000029 de kit H-5 de ADN SkyPaint™ para cromosomas humanos) se puede llevar a cabo en cromosomas en metafase; sondas de enumeración de cromosomas (CEP) para cada uno de los cromosomas humanos (1-22, X, Y), en especial 13,18, 21, X e Y.

35 El análisis de PRINS se ha empleado en la detección de supresión genética (Tharapel SA y Kadandale JS, 2002. Am. J. Med. Genet. 107: 123-126), determinación del sexo del feto (Orsetti, B., *et al.*, 1998. Prenat. Diagn. 18: 1014-1022), e identificación de aneuploidía cromosómica (Mennicke, K. *et al.*, 2003. Fetal Diagn. Ther. 18: 114-121).

40 En la técnica se conocen algunos métodos para realizar análisis de PRINS e incluyen, por ejemplo, los que se describen en Coullin, P. *et al.* (Am. J. Med. Genet. 2002, 107: 127-135); Findlay, I., *et al.* (J. Assist. Reprod. Genet. 1998, 15: 258-265); Musio, A., *et al.* (Genome 1998, 41: 739-741); Mennicke, K., *et al.* (Fetal Diagn. Ther. 2003, 18: 114-121); Orsetti, B., *et al.* (Prenat. Diagn. 1998, 18: 1014-1022). En resumen, los portaobjetos que contienen cromosomas en interfase se desnaturalizan durante 2 minutos a 71 °C en una solución de formamida al 70 % en 2X SSC (pH 7,2), se deshidratan en una serie de etanol (70, 80, 90 y 100 %) y se colocan en un bloque de placa plana de un ciclador de temperatura programable (tal como el termociclador PTC-200 adaptado para portaobjetos de vidrio que está disponible de MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA). Normalmente, la reacción de PRINS se lleva a cabo en presencia de cebadores no etiquetados y una mezcla de los dNTP con un dUTP etiquetado (por ejemplo, fluoresceína-12-dUTP o digoxigenina-11-dUTP para una detección directa o indirecta, respectivamente). Como alternativa, o adicionalmente, los cebadores específicos de secuencia se pueden etiquetar en el extremo en la posición 5' usando, por ejemplo, moléculas de 1-3 fluoresceína o cianina 3 (Cy3). Por lo tanto, una mezcla de reacción habitual de PRINS incluye cebadores específicos de secuencia (50-200 pmol en un volumen de reacción de 50 µl), dNTP sin etiquetar (0,1 mM de dATP, dCTP, dGTP y 0,002 mM de dTTP), dUTP etiquetado (0,025 mM) y Taq ADN polimerasa (2 unidades) con el tampón de reacción apropiado. Una vez que el portaobjetos alcanza la temperatura de hibridación deseada, la mezcla de reacción se aplica en el portaobjetos y el portaobjetos se cubre con un cubre objetos. Se permite que la hibridación de los cebadores específicos de secuencia se produzca durante 15 minutos, tras lo cual las cadenas cebadas se alargan a 72 °C durante otros 15 minutos. Después del alargamiento, los portaobjetos se lavan tres veces a temperatura ambiente en una solución de 4x SSC/Tween-20 al 0,5 % (4 minutos cada uno), seguido de un lavado de 4 minutos en PBS. A continuación, los portaobjetos se someten a contra tinción de núcleos usando DAPI o yoduro de propidio. Los portaobjetos teñidos con fluorescencia se pueden visualizar usando un microscopio de fluorescencia y la combinación de filtros adecuada (por ejemplo, DAPI, FITC, TRITC, FITC-rodamina).

65 Se observará que en la misma realización de PRINS se pueden usar varios cebadores que son específicos para varias dianas usando conjugados diferentes en la posición 5'. Por lo tanto, el análisis de PRINS se puede usar como un ensayo multicolor para la determinación de la presencia y/o ubicación de varios genes o sitios cromosómicos.

Además, como se describe en Coullin *et al.*, (2002, mencionado anteriormente) el análisis de PRINS se puede llevar a cabo en el mismo portaobjetos que el análisis de FISH, preferentemente, antes del análisis de FISH.

La formación de bandas multicolores de alta resolución (MCB) en cromosomas en interfase se describe con detalle en Lemke *et al.* (Am. J. Hum. Genet. 71: 1051-1059, 2002). El método usa bibliotecas de ADN de microdissección de YAC/BAC y específicas de región como sondas de ADN para cromosomas en interfase. En resumen, para cada biblioteca de ADN específico de región, se escinden 8-10 fragmentos de cromosomas usando microdissección y el ADN se amplifica usando una reacción de PCR de oligonucleótidos degenerados. Por ejemplo, para tinción de MCB del cromosoma 5, se construyeron siete bibliotecas de ADN de microdissección de solapamiento, dos dentro del brazo p y cinco en el brazo q (Chudoba I., *et al.*, 1999; Cytogenet. Cell Genet. 84: 156-160). Cada una de las bibliotecas de ADN se etiqueta con una combinación única de fluorocromos y se realizan lavados de hibridación y post-hibridación usando protocolos convencionales (véase, por ejemplo, Senger *et al.*, 1993; Cytogenet. Cell Genet. 64: 49-53). El análisis de la formación de bandas multicolores se puede llevar a cabo usando el sistema de formación de imágenes Isis/mFISH (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Alemania). Se observará que aunque la tinción de MCB en cromosomas en interfase se documentó para un solo cromosoma a la vez, se puede concebir que algunas sondas adicionales y combinaciones únicas de fluorocromos se puedan usar para tinción de MCB de dos o más cromosomas en un único análisis de MCB. Por lo tanto, esta técnica se puede usar junto con la presente invención para identificar anomalías cromosómicas fetales, en particular, para la detección de anomalías cromosómicas específicas que se sabe que están presentes en otros miembros de la familia.

La FISH cuantitativa (Q-FISH) permite la detección de anomalías cromosómicas mediante la medida de variaciones en la intensidad de fluorescencia de sondas específicas. Q-FISH se puede llevar a cabo usando sondas de oligonucleótidos de Ácido Nucleico Peptídico (PNA). Las sondas de PNA son miméticos de ADN sintéticos en los que la cadena principal de fosfato de azúcar se sustituye mediante la repetición de unidades de N-(2-aminoetil) glicina unidas por un enlace amino y a la que se fijan las nucleobases (Pellestor F y Paulasova P, 2004; Chromosoma 112: 375-380). Por lo tanto, la cadena principal hidrófoba y neutra permite una hibridación de alta afinidad y específica de las sondas de PNA a sus homólogos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN cromosómico). Tales sondas se han aplicado en núcleos en interfase para controlar la estabilidad de los telómeros (Slijepcevic, P. 1998; Mutat. Res. 404: 215-220; Henderson S., *et al.*, 1996; J. Cell Biol. 134: 1-12), la presencia de anemia de Fanconi (Hanson H, *et al.*, 2001, Cytogenet. Cell Genet. 93: 203-6) y anomalías cromosómicas numéricas tales como trisomía 18 (Chen C, *et al.*, 2000, Mamm. Genome 10: 13-18), así como monosomía, duplicación y supresión (Taneja KL, *et al.*, 2001, Genes Chromosomes Cancer. 30: 57-63).

Como alternativa, la Q-FISH se puede llevar a cabo mediante cohibridación de sondas de pintado de cromosomas completos (por ejemplo, para los cromosomas 21 y 22) en núcleos en interfase como se describe en Truong K *et al.*, 2003, Prenat. Diagn. 23: 146-51.

Cualquiera de los métodos de análisis cromosómico descritos anteriormente en el presente documento que se llevan a cabo en una célula de trofoblasto de la muestra biológica materna se puede usar para detección de anomalías cromosómicas en el producto de la concepción.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anomalía cromosómica" se refiere a un número anómalo de cromosomas (por ejemplo, trisomía 21, monosomía X) o a anomalías de la estructura del cromosoma (por ejemplo, supresiones, translocaciones, inversión, etc).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la anomalía cromosómica puede ser aneuploidía cromosómica (es decir, trisomía y/o monosomía completa y/o parcial), translocación, reorganización subtelomérica, supresión, microsupresión, inversión y/o duplicación (es decir, duplicación cromosómica completa y/o parcial).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención la trisomía puede ser trisomía 21 [usando por ejemplo, la sonda etiquetada de color naranja LSI 21q22 (n.º de cat 5J13-02 de Abbott)], trisomía 18 [usando por ejemplo, la sonda etiquetada de color verde CEP 18 (N.º de Cat 5J10-18 de Abbott); la sonda de CEP<sup>®</sup>18 (D18Z1, satélite  $\alpha$ ) Spectrum Orange<sup>™</sup> (N.º de Cat 5J08-18 de Abbott)], trisomía 16 [usando por ejemplo, la sonda CEP16 (N.º de Cat. 6J37-17 de Abbott)], trisomía 13 [usando por ejemplo, la sonda LSI<sup>®</sup> 13 SpectrumGreen<sup>™</sup> (N.º de Cat. 5J14-18 de Abbott)], y las trisomías XXY, XYY, o XXX que se pueden detectar usando por ejemplo, la sonda CEP de color verde para X y de color naranja para Y (n.º de cat SJ10-51 de Abbott); y/o la sonda CEP<sup>®</sup>X SpectrumGreen<sup>™</sup>/sonda CEP<sup>®</sup> Y (satélite  $\mu$ ) SpectrumOrange<sup>™</sup> (N.º de Cat. 5J10-51 de Abbott).

Las trisomías adicionales o trisomías parciales que se pueden detectar usando sondas FISH de específicas de cromosoma, cebadores de PRINS, tinción con Q-FISH y MCB incluyen, pero no se limitan a, trisomía 1q32-44 parcial (Kimya Y *et al.*, Prenat Diagn. 2002, 22: 957-61), trisomía 9p con trisomía 10p (Hengstschlager M *et al.*, Fetal Diagn Ther. 2002, 17: 243-6), mosaicismo por trisomía 4 (Zaslav AL *et al.*, Am J Med Genet. 2000, 95: 381-4), trisomía 17p (De Pater JM *et al.*, Genet Couns. 2000, 11: 241-7), trisomía 4q26-qter parcial (Petek E *et al.*, Prenat Diagn. 2000, 20:349-52), trisomía 9 (Van den Berg C *et al.*, Prenat. Diagn. 1997, 17:933-40), trisomía 2p parcial (Siffroi JP *et al.*, Prenat Diagn. 1994, 14: 1097-9), trisomía 1q parcial (DuPont BR *et al.*, Am J Med Genet. 1994, 50: 21-7), y/o trisomía 6p /monosomía 6q parciales (Wauters JG *et al.*, Clin Genet. 1993, 44: 262-9).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la anomalía cromosómica es una monosomía tal como, monosomía 22, 16, 21 y 15, que se sabe que están implicadas en aborto involuntario del embarazo (Munne, S. *et al.*, 2004. *Reprod Biomed Online*. 8: 81-90)].

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención la monosomía pueden ser monosomía X, monosomía 21, monosomía 22 [usando por ejemplo, la sonda LSI 22 (BCR) (Abbott, N.º de Cat. 5J17-24)], monosomía 16 (usando por ejemplo, la sonda CEP 16 (D16Z3) Abbott, N.º de Cat. 6J36-17) y monosomía 15 [usando por ejemplo, la sonda CEP 15 (D15Z4) (Abbott, N.º de Cat. 6J36-15)].
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la anomalía cromosómica puede ser una translocación, reordenación o microsupresión que está presente en al menos uno de los padres del feto. Estas incluyen, pero no se limitan a la microsupresión de 15q11-q13 que puede dar nacimiento a un niño con síndrome de Angelman o Prader Willi (Erdel M *et al.*, *Hum Genet*. 1996, 97: 784-93), mosaico para un cromosoma marcador supernumerario pequeño (SMC) (Giardino D *et al.*, *Am J Med Genet*. 2002, 111: 319-23); translocación de t(11;14)(p15;p13) (Benzacken B *et al.*, *Prenat Diagn*. 2001, 21: 96-8); translocación de t(8;11)(p23.2;p15.5) no equilibrada (Fert-Ferrer S *et al.*, *Prenat Diagn*. 2000, 20: 511-5); microsupresión de 11 q23 (Matsubara K, Yura K. *Rinsho Ketsueki*. 2004, 45: 61-5); supresión de 17p11.2 para síndrome de Smith-Magenis (Potocki L *et al.*, *Genet Med*. 2003, 5: 430-4); supresión de 22q13.3 (Chen CP *et al.*, *Prenat Diagn*. 2003, 23: 504-8); microsupresión de Xp22.3. (Enright F *et al.*, *Pediatr Dermatol*. 2003, 20: 153-7); supresión de 10p14 (Bartsch O, *et al.*, *Am J Med Genet*. 2003, 117A: 1-5); microsupresión de 20p (Laufer-Cahana A, *Am J Med Genet*. 2002, 112: 190-3.), síndrome de DiGeorge [del(22)(q11.2q11.23)], síndrome de Williams [supresiones de 7q11.23 y 7q36, Wouters CH, *et al.*, *Am J Med Genet*. 2001, 102: 261-5.]; supresión de 1p36 (Zenker M, *et al.*, *Clin Dysmorfol*. 2002, 11: 43-8); microsupresión de 2p (Dee SL *et al.*, *J Med Genet*. 2001, 38: E32); tipo 1 de neurofibromatosis (microsupresión de 17q11.2, Jenne DE, *et al.*, *Am J Hum Genet*. 2001, 69: 516-27); supresión de Yq (Toth A, *et al.*, *Prenat Diagn*. 2001, 21: 253-5); síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS, microsupresión de 4p16.3, Rauch A *et al.*, *Am J Med Genet*. 2001, 99: 338-42); microsupresión de 1p36.2 (Finelli P, *Am J Med Genet*. 2001, 99: 308-13); supresión de 11q14 (Coupry I *et al.*, *J Med Genet*. 2001, 38: 35-8); microsupresión de 19q13.2 (Tentler D *et al.*, *J Med Genet*. 2000, 37: 128-31); Rubinstein-Taybi (microsupresión de 16p13.3, Blough RI, *et al.*, *Am J Med Genet*. 2000, 90: 29-34); microsupresión de 7p21 (Johnson D *et al.*, *Am J Hum Genet*. 1998, 63: 1282-93); síndrome de Miller-Dieker (17p13.3), supresión de 17p11.2 (Juyal RC *et al.*, *Am J Hum Genet*. 1996, 58: 998-1007); microsupresión de 2q37 (Wilson LC *et al.*, *Am J Hum Genet*. 1995, 56: 400-7).

La invención de acuerdo con algunas realizaciones se puede usar para detectar inversiones [por ejemplo, cromosoma X invertido (Lepretre, F. *et al.*, *Cytogenet. Genome Res*. 2003. 101: 124-129; Xu, W. *et al.*, *Am. J. Med. Genet*. 2003. 120A: 434-436), cromosoma 10 invertido (Helszer, Z., *et al.*, 2003. *J. Appl. Genet*. 44: 225-229)], reordenamientos de cromosomas subteloaméricos crípticos (Engels, H., *et al.*, 2003. *Eur. J. Hum. Genet*. 11: 643-651; Bocian, E., *et al.*, 2004. *Med. Sci. Monit*. 10: CR143-CR151), y/o duplicaciones (Soler, A., *et al.*, *Prenat. Diagn*. 2003. 23: 319-322).

- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el análisis de ADN puede ser hibridación de transferencia de Southern, secuenciación directa de un producto de PCR [por ejemplo, amplificación de una secuencia genómica usando cebadores específicos de PCR seguido de una reacción de secuenciación usando, por ejemplo, los Kits de Secuenciación de Ciclo Cebador ABI PRISM® BigDye™ o Terminador BigDye™ de Applied Biosystems (Foster City, CA)], PCR de fluorescencia cuantitativa por ejemplo, para los cromosomas 13, 18, 21, X, Y [por ejemplo, kit Aneufast (Genomed), kit Q-Star (Elucigene) con las modificaciones necesarias para unas pocas células o células individuales], polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) [por ejemplo, RFLP en el ADN genómico usando una sonda etiquetada (es decir, RFLP de transferencia de Southern) o en un producto de PCR (es decir, PCR-RFLP)], oligonucleótido específico de alelo (ASO) [por ejemplo, mediante hibridación con oligonucleótidos específicos alélicos etiquetados con radiactividad (ASO) en ADN genómico (véase Conner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 278-282, 1983) o en productos de PCR (véase por ejemplo, Kerem B, *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8447-8451), PCR específica de alelo [por ejemplo, como se describe para la mutación Q493X de la fibrosis quística en Kerem B, 1990 (mencionado anteriormente)], PCR específica de metilación (MSPCR) [mediante tratamiento del ADN con bisulfito sódico que convierte los restos de citosina no metilados, pero no los metilados, en uracilo, seguido de amplificación de PCR como se describe en Buller A., *et al.*, 2000, *Mol. Diagn*. 5: 239-43], análisis con Pyrosequencing™ (Pyrosequencing, Inc. Westborough, MA, USA), análisis con Acicloprime™ (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, USA), transferencia puntual inversa, hibridación dinámica específica de alelo (DASH, Howell, W.M. *et al.*, 1999. *Dynamic allele-specific hybridization (DASH)*. *Nat. Biotechnol*. 17: 87-8), electroforesis en gel diagonal de matriz de microplaca [MADGE, Day, I.N. *et al.*, 1995. *High-throughput genotyping using horizontal polyacrylamide gels with wells arranged for microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE)*. *Biotechniques*. 19: 830-5], el sistema TaqMan (Holland, P.M. *et al.*, 1991. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 7276-80), así como diversas tecnologías de "chip" de ADN tales como las micromatrices de GeneChip (por ejemplo, chips de SNP de Affymetrix) que se desvelan en la Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 6.300.063 de Lipshutz, *et al.* 2001. *Genetic Bit Analysis (GBA™)* que se describe en Goelet, P. *et al.* (Sol. de PCT N.º 92/15712), sondas de ácido nucleico de péptido (PNA, Ren B, *et al.*, 2004. *Nucleic Acids Res*. 32: e42) y de ácidos nucleicos bloqueados (LNA Latorra D, *et al.*, 2003. *Hum. Mutat*. 22: 79-85), Molecular Beacons (Abravaya K, *et al.*, 2003. *Clin Chem Lab Med*. 41: 468-74),

colorante de intercalado [Germer, S. y Higuchi, R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res.* 9: 72-78 (1999)], cebadores de FRET (Solinas A *et al.*, 2001. *Nucleic Acids Res.* 29: E96), AlphaScreen (Beaudet L, *et al.*, *Genome Res.* 2001, 11(4): 600-8), SNPstream (Bell PA, *et al.*, 2002. *Biotechniques. Supl.*: 70-2, 74, 76-7), miniselección Multiplex (Curcio M, *et al.*, 2002. *Electrophoresis.* 23: 1467-72), SnaPshot (Turner D, *et al.*, 2002. *Hum Immunol.* 63: 508-13), MassEXTEND (Cashman JR, *et al.*, 2001. *Drug Metab Dispos.* 29: 1629-37), ensayo de GOOD (Sauer S, y Gut IG. 2003. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 17: 1265-72), miniselección de micromatrices (Liljedahl U, *et al.*, 2003. *Pharmacogenetics.* 13: 7-17), extensión de cebador de matriz (APEX) (Tonisson N, *et al.*, 2000. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 165-70), extensión de cebador de micromatriz (O'Meara D, *et al.*, 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: e75), matrices de etiqueta (Fan JB, *et al.*, 2000. *Genome Res.* 10: 853-60), incorporación dirigida por molde (TDI) (Akula N, *et al.*, 2002. *Biotechniques.* 32: 1072-8), polarización con fluorescencia (Hsu TM, *et al.*, 2001. *Biotechniques.* 31: 560, 562, 564-8), ensayo colorimétrico de ligación de oligonucleótidos (OLA, Nickerson DA, *et al.*, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8923-7), OLA codificada por secuencia (Gasparini P, *et al.*, 1999. *J. Med. Screen.* 6: 67-9), ligación de micromatriz, reacción en cadena de ligasa, sondas de Padlock, amplificación de círculo de Rolling, ensayo de Invader (revisado en Shi MM. 2001. *Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies.* *Clin Chem.* 47: 164-72), microsferas codificadas (Rao KV *et al.*, 2003. *Nucleic Acids Res.* 31: e66) y MassArray (Leushner J, Chiu NH, 2000. *Mol Diagn.* 5: 341-80).

Las sustituciones de ácido nucleico también se pueden identificar en moléculas de ARNm derivadas de la células del trofoblasto aislada. Tales moléculas de ARNm se someten primero a una reacción de RT-PCR tras lo cual se secuencian directamente o se someten a cualquiera de los métodos de análisis de ADN descritos anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el análisis de ADN puede identificar una anomalía en el ADN fetal o determinar la paternidad del feto. La anomalía del ADN puede ser una sustitución de un solo nucleótido (por ejemplo, que causa una enfermedad o que comprende un polimorfismo), reordenamientos de ADN, inversión, supresión, duplicación, inserción, microsupresión, microinserción, supresión corta, inserción corta, sustitución de varios nucleótidos, metilación del ADN anómalo y pérdida de huella (LOI).

Por ejemplo, una anomalía del ADN se puede asociar con enfermedades genéticas tales como un trastorno de un solo gen o trastornos recesivos, que se pueden someter a ensayo de forma prenatal si ambos padres son portadores [por ejemplo, fibrosis quística, enfermedad de Canavan, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, disautonomía familiar, enfermedad de Niemann-Pick (AB), anemia de Fanconi (Fanconi -C, Fanconi -A), ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, fiebre mediterránea familiar (FMF), displasia espondiloeipifisiaria tardía ligada al cromosoma X, factor XI, mucopolisidosis 4, síndrome I de Usher, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo I, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo III, enfermedad en la orina de jarabe de arce, atrofia muscular espinal (SMA), Nematina, Gaucher de tipo I, deficiencia de alfa anti tripsina, Ataxia Telangiectasia, enfermedad muscular 2B del cinturón de las extremidades, MLC-1, enfermedad de Costafs, fenilcetonuria, leucodistrofia metacromática, trastornos vinculados con el sexo (por ejemplo, X frágil, hemofilia) un trastorno de la huella [por ejemplo, síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de distonía mioclónica (MDS)], predisposición a diversas enfermedades cancerosas (por ejemplo, mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2), trastornos dominantes (por ejemplo, enfermedad de Huntington, síndrome de Marfan, Cadasil), así como trastornos que están causados por anomalías cromosómicas menores (por ejemplo, mosaicismo de trisomía menor, duplicación de regiones subteloméricas, supresiones o duplicaciones intersticiales), que están por debajo del nivel de detección de cromosomas *in situ* y/o métodos de análisis de ADN convencionales (es decir, FISH, Q-FISH, MCB y PRINS).

Como se usa en el presente documento, la expresión "paternidad" se refiere a la probabilidad de que un padre potencial de un producto de la concepción sea el padre biológico de ese producto de la concepción.

La determinación de la paternidad de un producto de la concepción se puede llevar a cabo sometiendo el ADN de la célula de trofoblasto a análisis basados en PCR o RFLP (Strom CM, *et al.*, *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 174: 1849-53; Yamada Y, *et al.*, 2001. *J Forensic Odontostomatol.* 19: 1-4) y comparando los marcadores polimórficos del producto de la concepción [por ejemplo, sustitución, supresión, inserción, inversión, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), repeticiones en tándem corto (STR), repeticiones de variante minisatélite (MVR)] en un conjunto de marcadores polimórficos obtenidos a partir de un padre potencial.

Por ejemplo, los marcadores polimórficos usados en ensayos de paternidad incluyen las repeticiones de variante minisatélite (MVR) en los sitios MS32 (D1S8) o MS31A (D7S21) (Tamaki, K *et al.*, 2000, *Forensic Sci. Int.* 113: 55-62), las repeticiones en tándem corto (STR) en el sitio D1S80 (Ceacareanu AC, Ceacareanu B, 1999, *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 58: 281-8), el sitio DXYS156 (Cali F, *et al.*, 2002, *Int. J. Legal Med.* 116: 133-8), las sondas de RFLP "myo" y PYNH24 [Strom CM, *et al.*, (mencionado anteriormente) e Yamada Y, *et al.*, (mencionado anteriormente)] y/o la formación de oligotipos de regiones variables tales como HLA-II (Arroyo E, *et al.*, 1994, *J. Forensic Sci.* 39: 566-72).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el análisis de ADN comprende hibridación comparativa del genoma (CGH).

5 La Hibridación Comparativa del Genoma (CGH) se basa en una hibridación *in situ* cuantitativa fluorescente de dos colores (FISH) en cromosomas en metafase. En este método, un ADN de ensayo (por ejemplo, ADN extraído de la célula de trofoblasto de la presente invención) se etiqueta con un color (por ejemplo, verde) y se mezcla en una proporción 1:1 con un ADN de referencia (por ejemplo, ADN extraído de una célula de control) que se etiqueta con un color diferente (por ejemplo, rojo). En la técnica se conocen bien algunos métodos de amplificación y etiquetado de ADN del genoma completo (véase, por ejemplo, Wells D., *et al.*, 1999; Nucleic Acids Res. 27: 1214-8). En resumen, el ADN genómico se amplifica usando un cebador de oligonucleótido degenerado [por ejemplo, 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG; SEC ID N°: 24 (Telenius, H., *et al.*, 1992; Genomics 13:718-25)] y el ADN amplificado se etiqueta usando, por ejemplo, el Spectrum Green-dUTP (para el ADN de ensayo) o el Spectrum Red-dUTP (para el ADN de referencia). La mezcla de muestras de ADN etiquetado se precipita con ADN Cot1 (Gibco-BRL) y se vuelve a suspender en una mezcla de hibridación que contiene, por ejemplo, formamida al 50 %, 2X SSC, a pH 7 y sulfato de dextrano al 10 %. Antes de la hibridación, las muestras de ADN etiquetado (es decir, las sondas) se desnaturalizan durante 10 minutos a 75 °C y se deja que se enfríen a temperatura ambiente durante 2 minutos. De forma análoga, las dispersiones de cromosomas en metafase se desnaturalizan usando protocolos convencionales (por ejemplo, deshidratación en una serie de etanol, desnaturalización durante 5 minutos a 75 °C en formamida al 70 % y 2X SSC). Las condiciones de hibridación incluyen incubación a 37 °C durante 25-30 horas en una cámara humidificada, seguido de lavados en 2X SSC y deshidratación usando una serie de etanol, básicamente como se describe en cualquier parte (Wells, D., *et al.*, 2002; Fertility and Sterility, 78: 543-549). La señal de hibridación se detecta usando un microscopio de fluorescencia y la proporción de la fluorescencia de color verde con respecto a la roja se puede determinar usando, por ejemplo, el software informático Applied Imaging (Santa Clara, CA). Si ambos genomas se representan por igual en los cromosomas en metafase (es decir, ninguna supresión, duplicación o inserción en el ADN derivada de la célula de trofoblasto) el etiquetado en los cromosomas en metafase es de color naranja. Sin embargo, las regiones que se suprimen o duplican en la célula de trofoblasto se tiñen con rojo o verde, respectivamente.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los cromosomas en metafase usados mediante el método de CGH derivan de una célula de control de referencia (es decir, un individuo normal) que tiene un cariotipo de 46, XY o 46, XX.

La hibridación genómica comparativa basada en matriz de ADN (CGH-matriz), que se describe en Hu, D.G., *et al.*, 2004, Mol. Hum. Reprod. 10: 283-289, es una versión modificada de CGH y se basa en la hibridación de una mezcla a 1:1 de las sondas de ADN de ensayo y referencia en una matriz que contiene bibliotecas de ADN específicas de cromosoma. En la técnica se conocen algunos métodos de preparación de bibliotecas de ADN específicas de cromosoma (véase, por ejemplo, Bolzer A., *et al.*, 1999; Cytogenet. Cell. Genet. 84: 233-240). En resumen, se obtienen cromosomas individuales usando microdissección o clasificación de flujo y el ADN genómico de cada uno de los cromosomas aislados se amplifica por PCR usando un cebador de oligonucleótido degenerado. Para retirar las secuencias de ADN repetitivas, el ADN amplificado se somete a cromatografía por afinidad junto con hibridación de sustracción negativa (usando, por ejemplo, ADN humano Cot-1 o una secuencia repetitiva específica de centrómero como sustractores), básicamente como se describe en Craig JM., *et al.*, 1997; Hum. Genet. 100: 472-476. Las bibliotecas de ADN específicas de cromosoma amplificadas se unen a continuación a un soporte sólido [(por ejemplo, portaobjetos SuperAmine (TeleChem, USA)], se secan, se hornean y se lavan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las sondas de ADN genómico etiquetadas (una mezcla a 1:1 de los ADN de ensayo y referencia) se mezclan con un ADN vehículo monoespecífico (por ejemplo, Cot-1 humano y/o ADN de esperma de salmón, Gibco-BRL), se precipitan en etanol y se vuelven a suspender en un tampón de hibridación tal como formamida desionizada al 50 %, 2X SSC, SDS al 0,1 %, sulfato de dextrano al 10 % y solución de Denhardt 5 x. Las sondas de ADN se desnaturalizan a continuación (80 °C durante 10 minutos), se hibridan previamente (37 °C durante 80 minutos) y se aplican sobre la matriz para hibridación de 15-20 horas en una incubadora húmeda. Después de la hibridación las matrices se lavan dos veces durante 10 minutos en formamida al 50 %/2X SSC a 45 °C y una vez durante 10 minutos en 1X SSC a temperatura ambiente, tras lo cual las matrices se aclaran tres veces en agua desionizada a 18,2 MΩ. Las matrices se escanean a continuación usando cualquier escáner de fluorescencia adecuado tal como el lector de micromatriz GenePix 4000B (Axon Instruments, USA) y se analizan usando el software GenePix Pro. 4.0.1.12 (Axon).

Se ha mostrado que la tecnología de matriz de CGH basada en ADN confirma anomalías fetales detectadas usando formación convencional de bandas G e identifica anomalías fetales adicionales tales como mosaicismo de trisomía 20, duplicación de la región telomérica 10q, supresión intersticial del cromosoma 9p y duplicación intersticial de la región PWS en el cromosoma 15q (Schaeffer, A.J., *et al.*, 2004; Am. J. Hum. Genet. 74: 1168-1174), translocación no equilibrada (Klein OD, *et al.*, 2004, Clin Genet. 65: 477-82), transposiciones subteloómicas no equilibradas (Ness GO *et al.*, 2002, Am. J. Med. Genet. 113: 125-36), inversiones no equilibradas y/o transposiciones cromosómicas (Daniely M, *et al.*, 1999; Cytogenet Cell Genet. 86: 51-5).



De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método de diagnóstico prenatal de un producto de la concepción comprende además el cultivo del trofoblasto antes de la etapa (b) en condiciones adecuadas para la proliferación del trofoblasto de acuerdo con la reivindicación 6.

5 Se debería indicar que con el fin de cultivar el trofoblasto *in vitro*, la viabilidad celular se debería conservar al seguir los procesos de identificación/aislamiento. Los expertos en la materia son capaces de seleccionar condiciones y ensayos que puedan conservar la viabilidad celular (por ejemplo, usando métodos de detección de proteínas tales como inmunofluorescencia seguido de aislamiento por FACS o MACS).

10 Por lo tanto, una célula o células de trofoblasto aisladas se pueden cultivar en un medio de cultivo tisular [por ejemplo, medio completo BioAMF-2, 01-194-1, Biological Industries, Beit Haemek; Medio Chang, Irvine Diagnostics (por ejemplo, CHANG MEDIUM® BMC 91004; CHANG MEDIUM® MF, 91005; CHANG MEDIUM® D con Antibióticos, 99404; CHANG MEDIUM® C con Antibióticos Liofilizado, 99419)] durante 4-10 días en una incubadora de cultivo tisular [tal como Hereus, Tuttenauer] a una temperatura de aproximadamente 37 °C. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células de trofoblasto se cultivan en portaobjetos con cámara (por ejemplo, portaobjetos con cámara Nunc Lab-Tek II 154526) que son adecuados para el ensayo o ensayos diagnósticos posteriores del producto de la concepción.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo de trofoblastos comprende al menos aproximadamente 5 veces más trofoblastos que una muestra biológica que contiene trofoblastos no cultivados.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el ensayo de diagnóstico del producto de la concepción comprende el análisis de cariotipo (por ejemplo, una fotomicrografía de los cromosomas del individuo que muestran el número, tamaño, y forma de cada tipo de cromosoma).

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el análisis de cariotipo se lleva a cabo usando un método de tinción tal como formación de bandas G (tinción de Giemsa), formación de bandas Q (tinción de mostaza de Quinacrina), formación de bandas R (Giemsa inversa), y formación de bandas C (formación de bandas de centrómero).

30 Por lo tanto, las enseñanzas de la invención se pueden usar para identificar anomalías cromosómicas y/o de ADN en un producto de la concepción, y/o determinar la paternidad de un producto de la concepción sin someter a la madre a procedimientos invasivos y arriesgados.

35 Los agentes que se han descrito anteriormente en el presente documento para detectar la expresión de los marcadores de trofoblasto anexina IV, citoqueratina-7, citoqueratina-8 y citoqueratina-19 (por ejemplo, los anticuerpos dirigidos frente a los marcadores de trofoblasto, las sondas de polinucleótidos capaces de hibridarse específicamente a los ARN del marcador de trofoblastos, por ejemplo, las sondas de polinucleótidos que se establecen en las SEC ID N<sup>o</sup>s: 12, 13, 14 o 15, los cebadores de PCR capaces de amplificar el ADNc de los marcadores de trofoblasto, tales como los que se establecen las SEC ID N<sup>o</sup>s:16-17, 18-19, 20-21 o 22-23) y los reactivos para el diagnóstico del producto de la concepción que se han descrito anteriormente (por ejemplo, un reactivo tal como una sonda de polinucleótido, un cebador o cebadores de PCR que se usan en FISH, PRINS, MCB, Q-FISH, CGH, CGH-matriz, análisis de ADN y ensayo de paternidad) se pueden incluir en un kit de diagnóstico/artículo de fabricación. De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el kit de diagnóstico/artículo de fabricación comprende además instrucciones y etiquetas que indican la aprobación de la FDA para su uso en el diagnóstico prenatal de un producto de la concepción o para un ensayo de embarazo.

50 Tal kit puede incluir, en recipientes separados, al menos uno de los agentes de identificación de trofoblasto descritos anteriormente (por ejemplo, un anticuerpo anti anexina IV, o una sonda de polinucleótidos capaz de hibridarse específicamente al ARNm de anexina IV) envasados en un recipiente y al menos uno de los reactivos de diagnóstico del producto de la concepción descritos anteriormente (por ejemplo, sondas de FISH) envasadas en un segundo recipiente. El kit puede incluir además agentes de formación de imágenes tales como enzimas, anticuerpos secundarios, tampones, sustratos cromogénicos, material fluorogénico envasado en un recipiente adicional. El kit también incluye tampones y conservantes apropiados para mejorar la vida media del kit.

55 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados se refieren a "que incluyen, pero no se limitan a".

60 La expresión "que consiste en" se refiere a "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste básicamente en" se refiere a que la composición, método o estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran de forma material las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicados.

65

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno" y "el" incluyen preferencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

5 A través de la presente solicitud, diversas realizaciones de la presente invención se pueden presentar en un formato de intervalos. Se debería entender que la descripción en formato de intervalos que simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debería considerar que la descripción de un intervalo desvela de forma específica todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debería considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 desvela de forma específica subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

15 Siempre que en el presente documento se indica un intervalo numérico, pretende incluir cualquier número mencionado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. En el presente documento las expresiones "que varía/varía entre" un número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente y pretenden incluir el primer y segundo números indicados todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

20 Como se usa en el presente documento el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada que incluyen, pero no se limitan a, las maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sean conocidos, o desarrollados fácilmente, a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos, por practicantes de las técnicas químicas, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

25 Se observa que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. No se considera que ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones sean características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

30 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se ha descrito anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones que sigue a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

40 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones mencionadas anteriormente ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

Por lo general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se establece en las Pat. de Estados Unidos N.ºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., New York (1980); algunos inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a través de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

65

## MATERIALES GENERALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

*Análisis proteómico*

5 *Preparación de muestras de sangre* - Las muestras de sangre separaron por centrifugación en gradiente de densidad individual (1,077 g/ml) en tubos Unisep (Nova-med u-16) durante 20 minutos 1000 g a temperatura ambiente. La capa superior de células que contienen células mononucleares se recogió y se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Biological Industries Israel Beit Haemek 020231A) que contenía Albúmina de Suero Bovino al 0,1 %-BSA (Sigma Aldrich A-9418). El recuento de las células se hizo usando un hemocitómetro (Fisher 0267110). Se depositaron  $1 \times 10^6$  células derivadas de cada muestra en dos portaobjetos de vidrio con carga positiva (Biogenex super congelado más portaobjetos de Menzel-Glaser MG051101) mediante centrifugación (Shandon Cytospin-3) y el resto de la muestra se congeló de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . Con el fin de calcular el nivel de "contaminación" de la muestra con glóbulos rojos (eritrocitos), la tinción con tetraclorhidrato de DAB-3,3' diaminobencidina (Sigma Aldrich D-6190) que identifica la hemoglobina se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante y posteriormente los portaobjetos se lavaron y se tiñeron con Hematoxilina (Merck 1.09253.0500).

20 *Aislamiento y purificación de trofoblastos* - Los trofoblastos se aislaron a partir de placentas del primer trimestre recién obtenidas como se ha descrito anteriormente en Blaschitz *et al.*, 1996. En resumen, el procedimiento incluía digestión enzimática usando combinación de solución de de tripsina al 0,25 % (Gibco 2550) y DNasa I (Sigma Aldrich D-4513) seguido de centrifugación en gradiente de densidad (1,124 g/ml) de Percoll (Sigma Aldrich P-1644). Este gradiente separa las células de trofoblastos en siete capas diferentes. Las células de trofoblastos se enriquecieron mediante separación magnética negativa de células (Dynal Biotech MPC-L 120.21) usando anticuerpo anti-CD-45RB (DAKO M0833) y anticuerpo anti-CD-90 - Fibroblastos (Dianova DIA 100). Los anticuerpos se incubaron con perlas magnéticas de oveja anti-ratón (Dynal Biotech 110.31). El tubo de células se unió a un campo magnético. Las células etiquetadas de forma magnéticamente (no trofoblastos) se atrajeron por al imán mientras que las células no etiquetadas de forma magnética (supuestamente trofoblastos) se mantuvieron en la solución y se recogieron en un tubo separado. Se depositaron  $1 \times 10^5$  células derivadas de cada muestra en dos portaobjetos de vidrio con carga positiva (Biogenex super congelado más portaobjetos de Menzel-Glaser Mug051101) por centrifugación (Shandon Cytospin-3) y el resto de la muestra se congeló de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . Las células de trofoblasto se identificaron mediante tinción con inmunofluorescencia que reconoce células que expresan citoqueratina-7 de antígeno primario (DAKO M701801). Las células se etiquetaron con un anticuerpo monoclonal anti humano de ratón frente a CK7, clon OV-TL12/30, a una dilución 1:100 en PBS/BSA al 0,1 % durante 30 minutos a ambiente temperatura y con se tiñeron con anticuerpo de burro anti ratón fluorescente secundario (clon LP5K de Chemicon), a una dilución 1:100 en PBS/BSA al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para calcular el alcance de la contaminación de fibroblastos, las células aisladas se incubaron con anticuerpos monoclonales frente a Vimentina (clon V9 M0725 de DAKO) a una dilución 1:100 en PBS/BSA al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y con un anticuerpo de burro anti ratón fluorescente secundario (CBL194F de Chemicon), a una dilución 1:100 en PBS/BSA al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente.

45 *Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2-D PAGE)* - El enfoque isoeléctrico se realizó con tiras de IPG disponibles en el mercado (Amersham Biosciences: 18 cm, pH 4-7). Las muestras se cargaron mediante rehidratación durante 24 horas en solución que contenía tampón de lisis (urea 7 M de Applichem Biochemica, Darmstadt, Alemania) tiourea 2 M de Sigma Aldrich), sulfonato de dimetilbencil-amonio propano 0,2 M (NDSB, ICN Biomedicals, Eschwege, Alemania), ditiotretol al 1 % (DTT) (Applichem), CHPS al 4 % (Applichem), Pharmalytes al 0,5 % (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) y una traza del colorante azul de bromofenol (Serva Heidelberg, Alemania). El enfoque isoeléctrico se realizó con la unidad MultiphorII (Amersham Biosciences). La separación en la segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida de T al 12,5 % y C al 2,6 % en el sistema investigador de electroforesis de 2-D (Genomic Solutions) con aproximadamente 2 W por gel. Los geles analíticos y preparativos se cargaron con 100 y 800  $\mu\text{g}$  de extracto de proteína en bruto, respectivamente. Los geles analíticos se tiñeron con Azul de Coomassie.

55 *Análisis cuantitativo de imágenes* - El análisis cuantitativo de las imágenes de PAGE en 2-D se realizó con el software Z3 (Compugen, Tel Aviv, Israel), usando la opción de Gel maestro sin procesar (RMG) para crear un gel sintético. El volumen de la aplicación se calculó mediante una multiplicación de la zona de la aplicación con su intensidad. La normalización de los volúmenes de aplicación para comparación entre diferentes genes se realizó con el método de Volumen de Aplicación Total. En este método, el volumen total de todas las aplicaciones en el gel divide el volumen de cada aplicación.

60 *Identificación de proteínas* - La identificación se realizó con la aplicación aislada de geles teñidos con azul de Coomassie. Esto se consiguió con espectrometría de masas, de acuerdo con protocolos establecidos como lo han descrito anteriormente Bandow *et al.*, 2003 (Bandow JE, Becher D, Büttner K, Hochgräfe F, Freiberg C, Brötz H, Hecker M. The role of peptide deformylase in protein biosynthesis: a proteomic study. *Proteomics*. 2003 (3): 299-306). En resumen, las aplicaciones de proteínas se escindieron de geles en 2-D teñidos, las muestras se lavaron y se extrajeron del gel mediante difusión y a continuación los péptidos se eluyeron y se pusieron sobre una placa de

muestra para MALDI-MS. Las masas de los péptidos se determinaron en el modo reflector de ión positivo en un espectrómetro de masas Voyager-DE STR (Applied Biosystems) con calibración interna. Las huellas de masas de péptidos se compararon con bases de datos usando el programa MS-Fit (Hyper Text Transfer Protocol://prospector(dot)ucsf(dot)edu). Las búsquedas tuvieron en consideración oxidación de metionina, ácido piroglutámico, formación en la glutamina N-terminal y modificación de citosina por carbamidometilación o acrilamida, así como escisión parcial dejando un sitio de escisión interna.

*Anticuerpos Primarios* - clon LP3K de citoqueratina 8 de ratón anti-humano (Serotec, Raleigh, NC, USA; Número de catálogo 0200-0618), clon RCK 108 de citoqueratina 19 de ratón anti-humano (Dako Corp, Carpintería, CA, USA; Número de catálogo M0888), clon C-16 de anticuerpo policlonal de cabra anti-hemoglobina zeta (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; Número de catálogo sc-22723), clon D2 de ratón anti-anexina IV (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; Número de catálogo sc-46693), clon OV-TL12/30 de citoqueratina-7 de ratón anti-humano (Dako Corp, Carpintería, CA, USA; Número de catálogo M701801). Todos los anticuerpos se diluyeron a 1:50 en PBS (Biological Industries 02-023-1A) que contenía albúmina de suero bovino al 0,1 % (BSA; fracción V, Sigma St Louis, MO, USA, Número de catálogo A941B).

*Anticuerpos Secundarios* - F(ab')<sub>2</sub> de burro-anti ratón etiquetado con (FITC) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, UK; Número de catálogo 715-096-151; burro anti ratón etiquetado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories 715-095-151).

*Enriquecimiento de trofoblastos de sangre materna con separación magnética de células (MACS) basada en Anexina IV* - Se realizó centrifugación en gradiente de densidad de muestras de sangre materna heparinizadas (muestras de sangre de 20 ml) con tubos Unisep Maxi (Novamed Jerusalén, Israel, tubos U16). La capa de células de la capa leucocítica se lavó, se hizo recuento (se obtuvieron aproximadamente  $1.5 \times 10^7$  células nucleadas de una muestra de sangre de 20 ml) y se pusieron en contacto con un anticuerpo monoclonal anti-anexina IV (diluido a 1:50 en 200  $\mu$ l de PBS que contenía BSA al 0,1 %) mediante incubación de las células con el anticuerpo anti-anexina IV durante 30 minutos a temperatura ambiente a la vez que se agitaba. Se añadieron 500  $\mu$ l de tampón de MACS y a continuación las células se centrifugaron (10 minutos a 300 g) y se retiró el exceso del primer anticuerpo no unido (anti-anexina IV). Para el etiquetado de células positivas para anti-anexina, se añadió un anticuerpo secundario, F(ab')<sub>2</sub> de burro-anti ratón etiquetado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, UK; Número de catálogo 715-096-151) diluido a 1:50 en 200  $\mu$ l de PBS que contenía BSA al 0,1 % durante un periodo de incubación de 30 minutos a la vez que se agitaba. El tampón de MACS (500  $\mu$ l) se añadió a las células que se centrifugaron adicionalmente (10 minutos a 300 g) y el exceso de anticuerpo secundario no unido (burro anti-ratón con FITC) se retiró. Para enriquecimiento de las perlas magnéticas, se añadieron 20  $\mu$ l del anticuerpo monoclonal anti FITC acoplado a perlas magnéticas (perlas de FITC; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania, 130-048-701) diluido en 80  $\mu$ l de un tampón de MACS [PBS a PH 7,2 (Biological Industries 02-023-1A) que contenía BSA al 0,5 % (Sigma Aldrich A-9418) y EDTA 2 mM (Sigma Aldrich E-7889)] a las células y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Se añadieron 500  $\mu$ l de tampón de MACS y las células se centrifugaron a continuación (10 minutos a 310 g) para retirar el exceso de perlas no unidas y se volvió a suspender en 500  $\mu$ l de tampón de MACS. A continuación, las células se cargaron en columnas Mini-Macs® (Miltenyi Biotec, 130-042-201) y las células positivas para MACS se eludieron de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se hizo el recuento de células positivas para MACS y se volvieron a suspender en 250  $\mu$ l de PBS/BSA al 0,1 % seguido de citocentrifugación (usando el Shandon cytospin 3, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA USA) en portaobjetos de microscopio como se ha descrito anteriormente (Guetta *et al.*, 2005). Las células etiquetadas con Anexina-IV se observaron siguiendo la fluorescencia de FITC usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss).

Como alternativa, las células de la capa leucítica (aproximadamente  $1.5 \times 10^7$  células nucleadas) se incubaron con el anticuerpo primario [anticuerpo Anexina-IV (diluido a 1:50 en 200  $\mu$ l de PBS que contenía BSA al 0,1 %, 30 minutos a temperatura ambiente a la vez que se agitaba)], se lavaron (mediante centrifugación durante 10 minutos a 300 g), y a continuación se incubaron con 20  $\mu$ l de anticuerpo secundario acoplado a perlas (cabra anti-ratón acoplado hacer las magnéticas Miltenyi Biotec 130-048-40280) y 80  $\mu$ l de tampón de MACS durante un periodo de incubación de 15 minutos a 4 °C. A continuación, el exceso de perlas se retiró como se ha descrito anteriormente y se realizó el protocolo de MACS con columnas Mini-Macs® (130-042-201, Miltenyi Biotec). Los portaobjetos se prepararon con las células positivas para MACS y se sometieron adicionalmente a análisis de inmunofluorescencia y/o FISH.

*Protocolo para enriquecimiento de trofoblastos con MACS a partir de sangre materna con antígenos intercelulares (no forma parte de la presente invención)* - El protocolo se desarrolló con anticuerpos CK-7, sin embargo, se puede aplicar con anticuerpos adicionales dirigidos frente a antígenos intracelulares. Las muestras de sangre se separaron como se ha descrito anteriormente (usando la centrifugación en gradiente de densidad con tubos Unisep Maxi), las células nucleadas se fijaron en 1 ml de paraformaldehído al 1,5 % (Sigma, F-1635) durante una hora a temperatura ambiente con agitación, seguido de centrifugación a 300 g durante 10 minutos, se lavaron con 1 ml de PBS que contenía BSA al 0,5 % y se centrifugaron (300 g durante 10 minutos). Se añadieron 100  $\mu$ l de agente de bloqueo de FcR (Miltenyi Biotec, 130-059-901) y el anticuerpo primario [por ejemplo, clon OV-TL12/30 de citoqueratina-7, de ratón anti-humano, anti CK-7 (Dako Corp, Carpintería, CA, USA; Número de catálogo M701801)] diluido a 1:50 en PBS/suero bovino fetal al 0,5 %/Saponina al 0,3 % (Sigma, S-4521) a las células durante un periodo de incubación

de 30 minutos a temperatura ambiente (TA) con agitación. A continuación, las células se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos y se lavaron en 1 ml de PBS/BSA al 0,1 % y se centrifugaron de nuevo. Se añadieron 20 µl de un anticuerpo secundario acoplado a perlas (microperlas de cabra - anti ratón, Miltenyi Biotec130-048-402) diluidas en 80 µl de un tampón de MACS durante un periodo de incubación de 30 minutos a 4 °C. Después de añadir 500 µl de tampón de MACS, el exceso de perlas se retiró a continuación (mediante centrifugación durante 10 minutos a 300 g) y se realizó el protocolo de MACS con columnas Mini-Macs® (130-042-201, Miltenyi Biotec). Las células positivas para MACS se citocentrifugaron adicionalmente como se ha descrito anteriormente y se sometieron al inmunofluorescencia usando por ejemplo, anticuerpo anti-CK-7 seguido de un anticuerpo secundario etiquetado con FITC como se ha descrito anteriormente y/o análisis de FISH.

*Inmunofluorescencia seguida de enriquecimiento con MACS (no forma parte de la presente invención)* – El anticuerpo primario - clon OV-TL12/30 de citoqueratina-7 de ratón anti-humano (Dako Corp, Carpintería, CA, USA; Número de catálogo M701801) se diluyó a 1:50 en PBS/suero bovino fetal al 0,5 %/Saponina al 0,3 % (Sigma, S-4521). Después de fijación en acetona (Merck 1.00014.2500) durante 15 minutos los portaobjetos aclararon dos veces durante 5 minutos en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con anticuerpo anti-citoqueratina 7. Posteriormente, todos los portaobjetos se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBS y la detección se realizó mediante incubación de los portaobjetos con el anticuerpo de burro anti ratón etiquetado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories 715-095-151; diluido a 1:50 en PBS / BSA al 0,1 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces durante 5 minutos en PBS. A continuación, los portaobjetos se secaron y se tiñeron con DAPI (Vector, H-1200).

*Análisis de microscopía* - El análisis de portaobjetos después de tinción con inmunofluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia (microscopio de fluorescencia Axioscope de Zeiss). Las células positivas se identificaron mediante tinción citoplasmática de color verde (FITC) y se hizo contratinción de los núcleos con DAPI (Vector). Se hizo recuento del número de células positivas y se calculó su porcentaje entre el número total de células en el portaobjetos. Las fotomicrografías se prepararon con el software Cytovision (Applied Imaging).

*Hibridación in situ de Fluorescencia (FISH) después de enriquecimiento de MACS* - Los portaobjetos se fijaron en metanol: ácido acético (3:1) dos veces con dos incubaciones de 15 minutos, a temperatura ambiente, se lavaron en PBS y se deshidrataron a -20 °C, en soluciones de etanol al 70 % 90 % y 100 %, 2 minutos cada una. Los portaobjetos se desnaturalizaron en formamida desionizada al 70 % (Sigma) en 2 X SSC (2X de cloruro de citrato sódico) a 75 °C durante 5 minutos, deshidratados en alcohol como se ha descrito anteriormente y se transfirieron a una placa caliente (56 °C). La sonda de enumeración de centrómeros de cromosoma X (CEP) y la sonda de heterocromatina Y sat III o Y CEP (Vysis, Downer's Grove, IL, USA) se mezclaron con tampón de hibridación proporcionado por el fabricante y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 75 °C. La mezcla de sondas (5 µl) se aplicó sobre el área que contenía células y se cubrió con un cubreobjetos redondos (12 mm de diámetro). La hibridación se realizó en una cámara húmeda a 37 °C durante 4 horas, los cubreobjetos se retiraron y los portaobjetos se lavaron en 0,4 X SSC/NP40 al 0,03 % (NP-40 Fluka Biochemika 74388) a 74 °C durante 2 minutos y en 2 X SSC/NP40 0,01 % durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió Vectashield antivaho (H-1200Vector, Burlingame, CA) que contenía reactivo de tinción de ADN de diclorhidrato de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a los porta objetos después de etapas de lavado y secado al aire a temperatura ambiente.

#### EJEMPLO 1

#### IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE TROFOBLASTO MEDIANTE ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO

##### Resultados Experimentales

*Preparación de trofoblastos y muestras de células de sangre periférica para electroforesis en gente dos dimensiones (2-D)* – Las muestras de trofoblastos y de células de sangre periférica se obtuvieron de mujeres, que se someten a interrupción del embarazo en el primer trimestre. Los trofoblastos se aislaron de tejido de placenta después de la interrupción del embarazo realizada bajo las indicaciones sociales. La pureza de las preparaciones de trofoblastos aislados era elevada (un 85-94 % de células positivas), con baja contaminación de fibroblastos (un 0-12 % - células positivas).

*Identificación de proteínas con un patrón único de expresión en trofoblastos en comparación con muestras de sangre periférica* – El aislamiento y la identificación de las proteínas se realizó con tecnología proteómica. Los resultados del análisis en gel 2-D (Figura 1) reveló muchas diferencias en la expresión de proteínas entre las células de sangre materna y trofoblastos derivados de placenta. Las aplicaciones de proteínas más importantes que aparecieron en las muestras de placenta, pero que estaban ausentes en las muestras de sangre se aislaron, se purificaron y se identificaron. Las proteínas identificadas fueron: citoqueratina 7 (N.º de Registro en GenBank NP\_005547; N.º de GI 30089956; SEC ID N.º: 1), citoqueratina 8 (N.º de Registro en GenBank NP\_002264; N.º de GI 4504919; SEC ID N.º: 2), citoqueratina 19 (N.º de Registro en GenBank NP\_002267; N.º de GI 24234699; SEC ID N.º: 3), Zeta globina (N.º de Registro en GenBank NP\_005323; N.º de GI 4885397; SEC ID N.º: 4), A-gamma globina (N.º de Registro en GenBank NP\_000550; N.º de GI 28302131; SEC ID N.º: 5), G-gamma globina (N.º de Registro en GenBank

NP\_000175; N.º de GI 6715607; SEC ID N.º: 6) y anexina IV (N.º de Registro en GenBank NP\_001144; N.º de GI 4502105; SEC ID N.º: 7). De lo que Zeta globina, A-gamma globina y G-gamma globina también se expresan en células de sangre fetal, estas proteínas no se pueden considerar "específicas de trofoblastos". Además, A-gamma globina y G-gamma globina también se expresan en células maternas, por lo tanto no "específicas fetales".

5 *Validación en secciones de placenta* – La validación del patrón de expresión de los marcadores de específicos de trofoblastos recién identificados se realizó en las líneas de células de trofoblasto JAR (número de catálogo HTB-144 de la ATCC) y BeWo (número de catálogo CCL-98 de la ATCC), así como en secciones de placenta del primer trimestre *in situ* usando anticuerpos frente a citoqueratina 7 (un antígeno intracelular), citoqueratina 8 (un antígeno intracelular), citoqueratina 19 (un antígeno intracelular) y anexina IV (un antígeno de la superficie celular). Se encontró que todos los marcadores se expresan en líneas de células trofoblásticas, así como secciones de placenta, lo que confirma que son marcadores adecuados para la recuperación de trofoblastos de la sangre materna. Se observó que la tinción de citoqueratina 7 era más fuerte que la tinción de Anexina IV (Figuras 2a-1).

15 Estos resultados demuestran la identificación de nuevos marcadores específicos de trofoblasto que se pueden usar para identificar células fetales en la sangre materna.

#### EJEMPLO 2

#### ENRIQUECIMIENTO DE LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS RARAS DE LA SANGRE MATERNA USANDO MACS BASADOS EN ANEXINA IV

##### *Resultados experimentales*

25 *MACS basados en anexina-IV en muestras de sangre materna* - Como se muestra en la Figura 3, la separación celular magnética (MACS) basada en anexina-IV de una muestra de sangre materna reveló una especie de grandes células raras que se tiñen de forma positiva con el anticuerpo de anexina IV.

30 *Análisis de FISH de MACS basado en anexina IV* - Las muestras de mujeres portadoras de un feto masculino se sometieron a la separación celular magnética con un anticuerpo anti-anexina. Las células aisladas por MACS se depositaron en portaobjetos de microscopio usando un Cytospin (Shandon) como se ha descrito anteriormente (Guetta *et al.*, 2005) y se sometieron adicionalmente a ideación fluorescente *in situ* (FISH) usando las sondas específicas de los cromosomas X e Y (Vysis) como se ha descrito anteriormente (Guetta *et al.*, 2005). Las células fetales se identificaron de acuerdo a la presencia de un señal positiva para X e Y en el núcleo (Figura 4).

35 Estos resultados demuestran que las células fetales se pueden aislar de la sangre materna y se pueden someter al diagnóstico de producto de la concepción tal como análisis de ADN para la identificación de enfermedades monogénicas en los fetos de padres portadores; análisis cuantitativo de PCR para la detección de aneuploidía; FISH o expansión *in vitro* para análisis de cariotipo.

#### EJEMPLO 3

#### VALIDACIÓN DE LOS MARCADORES ESPECÍFICOS DE TROFOBLASTO EN LA SANGRE MATERNA

##### *Resultados Experimentales*

45 *Validación en muestras de sangre materna* - Veinte muestras de sangre materna se sometieron a ensayo para presencia de células positivas para Anexina IV usando enriquecimiento de MACS basado en anexina IV con anticuerpo secundario FITC seguido de micro perlas de anti FITC como se ha descrito anteriormente. En cada muestra de sangre de 20 ml se detectó un promedio de 6,25 células positivas para Anexina IV. En un 90 % de las muestras (Figuras 5a-c) se detectaron células positivas.

55 El origen fetal de las células enriquecidas por MACS con protocolo de Anexina IV se sometió a ensayo en 12 muestras de hembras que portaban fetos masculinos. La FISH se realizó con sondas de cromosomas sexuales y las células que presentaban una señal de X y una señal de Y se consideraron de un origen fetal. En cada muestra de sangre materna de 20 ml se detectó un promedio de 4,8 células fetales.

#### EJEMPLO 4 (no forma parte de la presente invención)

#### DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO USANDO ANTICUERPOS QUE RECONOCEN ANTÍGENOS INTRACELULARES

65 La citoqueratina 7, citoqueratina 8 y citoqueratina 19 son proteínas expresadas de forma intracelular. Por lo tanto, las modificaciones del protocolo de MACS se deben realizar en orden para permitir el enriquecimiento de células fetales usando MACS basado en anticuerpos. Los presentes inventores han desarrollado un nuevo protocolo para MACS usando anticuerpos dirigidos frente a proteínas intracelulares (descrito anteriormente en el presente documento en "Materiales Generales y Métodos Experimentales").

*Enriquecimiento de trofoblastos a partir de muestras de sangre usando MACS basado en CK-7* - Los experimentos con muestras de sangre mononuclear con adiciones de forma artificial con líneas de células de trofoblasto se aplicaron para someter al ensayo el protocolo que se optimizó para el marcador de CK7. Las Figuras 6a-b demuestran imágenes representativas de muestras de células que contienen células maternas y de trofoblastos.

*Validación del protocolo de MACS basado en CK-7 en muestras de sangre de hembras embarazadas* - A continuación, el protocolo se sometió a ensayo en 12 muestras de sangre materna de hembras embarazadas. Después del MACS basado en CK7, las células positivas se identificaron bien por FISH o mediante tinción con fluorescencia en un 91,5 % (11/12) de las muestras (Figuras 7a-b). En una muestra, no se observó tinción fetal mediante FISH.

*Comparación del nuevo protocolo de enriquecimiento de la invención para enriquecimiento usando kit/protocolos disponibles* - El enriquecimiento magnético de células que expresan los marcadores intracelulares CK7 y CK8 se realizó usando el kit de enriquecimiento y detección de células de carcinoma fabricado por Miltenyi con N.º de catálogo 130-060-30). Cuatro de cuatro muestras de sangre materna incluían células que eran positivas para tinción de CK7 y CK-8 combinadas (intervalo de 2-8 por muestra de sangre de 20 ml, 4 de promedio). Por el contrario, en el protocolo desarrollado por los presentes inventores, el número medio de células positivas para CK-7 era 14, y el intervalo era de 4-36 en 8/8 muestras procesadas con el protocolo de inmunofluorescencia que se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la Anexina IV y/o CK-7 son marcadores eficaces para enriquecimiento de trofoblastos de células de sangre materna. Además, éstos resultados demuestran el desarrollo de un nuevo método de enriquecimiento de MACS usando anticuerpos dirigidos frente a antígenos intracelulares.

#### **EJEMPLO 5**

##### **LA ANEXINA IV ES MÁS EFICAZ QUE HLA-G PARA EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE TROFOBLASTOS DE LA SANGRE MATERNA**

Como se muestra en la Figura 8, la aplicación del nuevo marcador de Anexina IV para enriquecimiento de trofoblastos en 20 muestras de sangre materna proporcionó 4 veces más células fetales (es decir, 6,25 células por muestra de sangre de 20 ml) en comparación con el marcador de HLA-G (es decir, 1,5 células por muestra de sangre de 20 ml). Además, la tasa de éxito de aislamiento de células de trofoblastos de la sangre materna era 18/20 usando la MACS basada en Anexina IV, en comparación con 10/13 usando la MACS basada en HLA-G.

Estos resultados demuestran que el nuevo marcador específico de trofoblastos puede aumentar la eficacia de detección de células fetales de la sangre materna.

#### **EJEMPLO 6**

##### **LOS TROFOBLASTOS AISLADOS DE SANGRE MATERNA PRESENTAN UNA CAPACIDAD PROLIFERATIVA**

Los presentes inventores han mostrado anteriormente que los trofoblastos que son positivos para HLA-G pueden proliferar en cultivo durante al menos 5-7 días (Guetta E., *et al.*, J. Histochemistry and Cytochemistry, 53: 337-339, 2005).

En el presente estudio, se mostró que los trofoblastos que se enriquecieron a partir de células de sangre materna usando un anticuerpo anti HLA-G, tenían una capacidad de proliferación como se ilustra mediante los cromosomas en metafase (Figura 9).

Se espera que el enriquecimiento de células de trofoblastos de la sangre materna usando el anticuerpo de Anexina IV (que se mostró que era más eficaz que el anticuerpo de HLA-G, véase la Figura 8, Ejemplo 6 mencionado anteriormente) seguido de cultivo de las células *in vitro* en condiciones que favorecen la expansión del trofoblasto, dé como resultado un rendimiento más elevado de células con proliferación de trofoblastos. Tales células se pueden usar para un análisis de cariotipo y diagnóstico prenatal posteriores.

#### **REFERENCIAS**

*(Referencias Adicionales se mencionan en el Texto)*

Publicación de PCT N.º WO2006/018849

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1996, 93 (2): 705-8.

Daya, D. y Sabet, L. The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. Am. J. Clin. Pathol. 1991, 95: 137-141.

5 Guetta E, Gutstein-Abo L., Barkai G. Trophoblasts isolated from the maternal circulation: In-vitro expansion and potential application in non-invasive prenatal diagnosis. *J. Histochem. Cytochem.* 2005, 53: 337-339.

6 Guetta E, Simchen MJ, Mammon-Daviko K, Gordon D, Aviram-Goldring A, Rauchbach N, Barkai G. Analysis of fetal blood cells in the maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions. *Stem Cells Dev.* 2004, 13: 93-99.

7 Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Mol. Dis.* 2003, 30: 13-21.

8 Kirszenbaum M, Moreau P, Teyssier M, Lafon C, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. *Hum. Immunol.* 1995, 43 (3): 237-41.

9 Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., Barre- Sinoussi, F. y Chaouat, G. Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J of Immunol Meth*, 2004, 286: 21-34.

10 Masuda, J., Takayama, E., Satoh, A., Ida, M., Shinohara, T., Kojima-Aikawa, K., Ohsuzu, F., Nakanishi, K., Kuroda, K., Murakami, M., Suzuki, K. y Matsumoto, I. Levels of annexin IV and V in the plasma of pregnant and postpartum women. *Thromb Haemost.* 2004, 91 (6): 1129-36.

11 Oudejans CB, Tjoa ML, Westerman BA, Mulders MA, van Wijk IJ, van Vugt JM. Circulating trophoblast in maternal blood. 2003, *Prenat. Diagn.* 23: 111-116.

12 Tamai Y, Ishikawa T, Bösl MR, Mori M, Nozaki M, Baribault H, Oshima RG, Taketo MM. Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development. *J. Cell Biol.* 2000, 151 (3): 563-72.

13 Tempfer CB, Bancher-Todesca D, Zeisler H, Schatten C, Husslein P, Gregg AR., Placental expression and serum concentrations of cytokeratin 19 in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000, 95 (5): 677-82.

14 Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol. Hum. Reprod.* 1999, 5 (12): 1162-5.

15 van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, Mulders MA, van Vugt JM, Loke YW, Oudejans CB. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001, 184: 991-997.

16 Vona G, Beroud C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am. J. Pathol.* 2002, 160: 51-58.

17 Yamamoto R, Kao LC, McKnight CE, Strauss JF 3rd. Cloning and sequence of cDNA for human placental cytokeratin.

18 8. Regulation of the mRNA in trophoblastic cells by cAMP. *Mol. Endocrinol.* 1990, 4 (3): 370-4.

35 Listado de secuencias

<110> Tel HaShomer Medical Research Infrastructure and Services Ltd.

40 <120> MÉTODOS Y KITS PARA DETECTAR CÉLULAS FETALES EN LA SANGRE MATERNA

<130> F-20566/EP-SSP

<140> 08738299.0

<141> 01-05-2008

<150> US 60/924.149

<151> 01-05-2007

45 <160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 1



ES 2 564 312 T3

Met Ser Ile His Phe Ser Ser Pro Val Phe Thr Ser Arg Ser Ala Ala  
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Arg Gly Ala Gln Val Arg Leu Ser Ser Ala Arg Pro Gly  
 20 25 30

Gly Leu Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Ala Ser Arg Pro Arg  
 35 40 45

Val Ala Val Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Pro Val Gly Ala Gly Ile Arg  
 50 55 60

Glu Val Thr Ile Asn Gln Ser Leu Leu Ala Pro Leu Arg Leu Asp Ala  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Leu Gln Arg Val Arg Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ile Lys  
 85 90 95

Thr Leu Asn Asn Lys Phe Ala Ser Phe Ile Asp Lys Val Arg Phe Leu  
 100 105 110

Glu Gln Gln Asn Lys Leu Leu Glu Thr Lys Trp Thr Leu Leu Gln Glu  
 115 120 125

Gln Lys Ser Ala Lys Ser Ser Arg Leu Pro Asp Ile Phe Glu Ala Gln  
 130 135 140

Ile Ala Gly Leu Arg Gly Gln Leu Glu Ala Leu Gln Val Asp Gly Gly  
 145 150 155 160

Arg Leu Glu Ala Glu Leu Arg Ser Met Gln Asp Val Val Glu Asp Phe  
 165 170 175

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *ex vivo* para identificar un trofoblasto, comprendiendo el método:
- 5 (a) detectar, en células nucleadas separadas de plasma y glóbulos rojos no nucleados de una muestra de sangre materna, la expresión de un marcador de trofoblastos, en el que dicho marcador de trofoblastos es anexina IV de superficie celular y en el que dicha detección se lleva a cabo usando un anticuerpo anti-anexina IV; y  
(b) clasificar como trofoblastos células nucleadas que presentan expresión de dicho marcador de trofoblastos;
- 10 identificando de ese modo el trofoblasto.
2. Un método *ex vivo* para aislar un trofoblasto de una muestra de sangre materna, que comprende:
- 15 (a) identificar el trofoblasto en la muestra de sangre materna de acuerdo con el método de la reivindicación 1, y  
(b) aislar el trofoblasto,
- aislando de ese modo el trofoblasto de la muestra de sangre materna.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente someter dicha muestra de sangre materna a una  
20 etapa de centrifugación en gradiente de densidad antes de la etapa (a).
4. Un método para someter a ensayo un embarazo en un sujeto, que comprende identificar, en una muestra de  
sangre materna del sujeto, un trofoblasto de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que una presencia  
de dicho trofoblasto en dicha muestra de sangre materna es indicativa del embarazo en el sujeto.
- 25
5. Un método *ex vivo* para diagnosticar de forma prenatal un producto de la concepción, que comprende
- (a) identificar, en una muestra de sangre materna de una mujer embarazada, un trofoblasto de acuerdo con el  
método de la reivindicación 1, y;
- 30 (b) someter dicho trofoblasto a un ensayo de diagnóstico de producto de la concepción,
- diagnosticando de ese modo de forma prenatal el producto de la concepción.
6. El método de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente cultivar dicho trofoblasto antes de la etapa (b) en  
35 condiciones adecuadas para proliferación de dicho trofoblasto.
7. Un método *ex vivo* para generar un cultivo de trofoblasto, que comprende
- (a) aislar trofoblastos de acuerdo con el método de la reivindicación 2, y
- 40 (b) cultivar dichos trofoblastos en condiciones adecuadas para proliferación de dichos trofoblastos,
- generando de ese modo el cultivo de trofoblastos.
8. El método de la reivindicación 2, en el que dicho aislamiento de dicho trofoblasto se lleva a cabo con separación  
45 magnética de células (MACS) o separación de células activadas por fluorescencia (FACS).
9. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que dicho ensayo de diagnóstico de producto de la concepción se lleva  
a cabo con un análisis seleccionado entre el grupo que consiste en un análisis cromosómico, un análisis de cariotipo  
y un análisis de ADN.
- 50
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho análisis cromosómico se lleva a cabo con hibridación *in situ*  
fluorescente (FISH), etiquetado *in situ* con cebado (PRINS), formación de bandas multicolores (MCB) y/o FISH  
cuantitativa (Q-FISH).
- 55
11. El método de la reivindicación 9, en el que dicho análisis de cariotipo se lleva a cabo usando un método de  
tinción seleccionado entre el grupo que consiste en formación de bandas G, formación de bandas R, formación de  
bandas Q y formación de bandas C.
- 60
12. El método de la reivindicación 9, en el que dicho análisis de ADN comprende hibridación comparativa del  
genoma (CGH) y/o identificación de al menos una sustitución de ácido nucleico.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha CGH se lleva a cabo usando cromosomas en metafase y/o  
una matriz de CGH.

14. El método de la reivindicación 5, 6, 9, 10, 11, 12 o 13, en el que dicho diagnóstico del producto de la concepción comprende la identificación de al menos un cromosoma y/o anomalía de ADN, y/o determinación de una paternidad del producto de la concepción.

5 15. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la detección de la expresión de citoqueratina-7.

16. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la detección de la expresión de citoqueratina-7, citoqueratina-8 y citoqueratina-19.

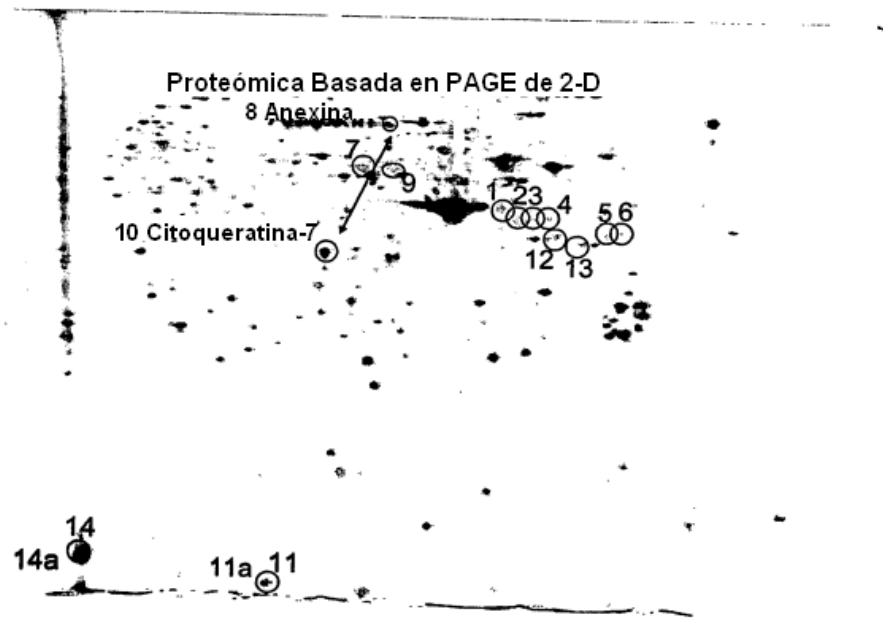


Fig. 1



Fig. 2a

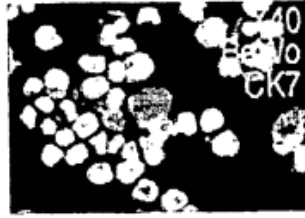


Fig. 2b



Fig. 2c

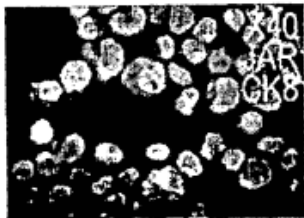


Fig. 2d



Fig. 2e



Fig. 2f



Fig. 2g



Fig. 2h



Fig. 2i



Fig. 2j

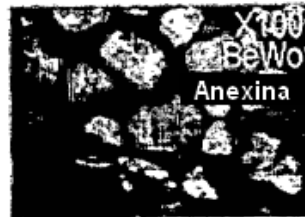


Fig. 2k



Fig. 2l



Fig. 3

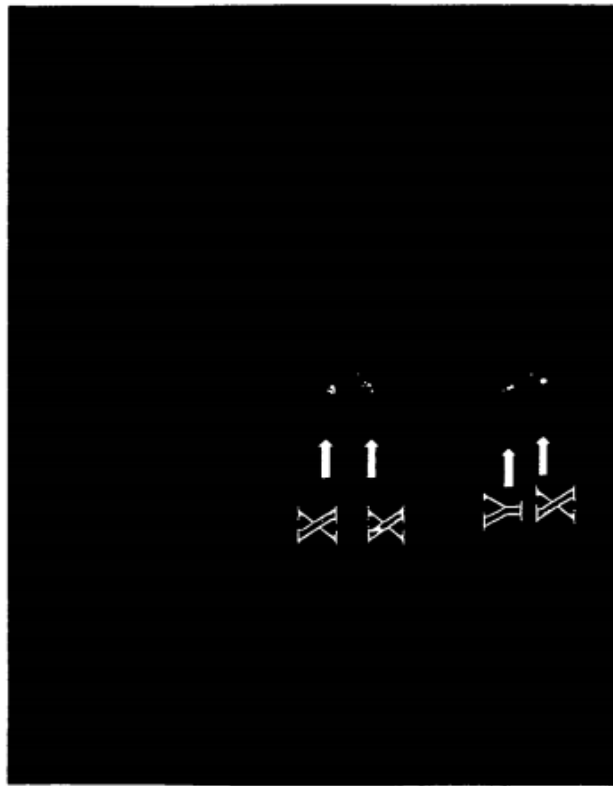


Fig. 4

Fig. 5b

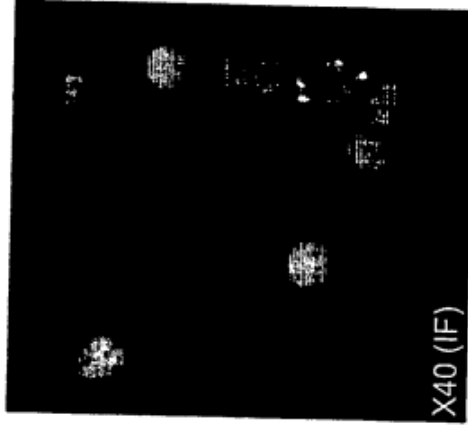


Fig. 5d

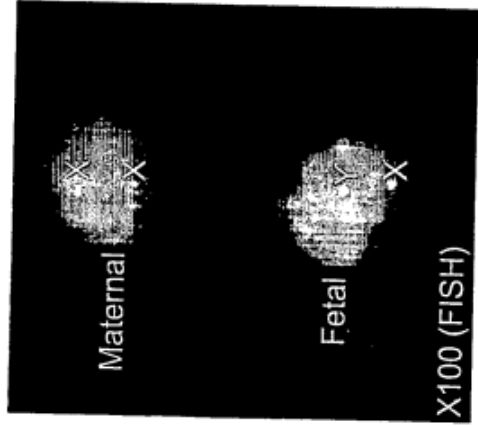


Fig. 5a

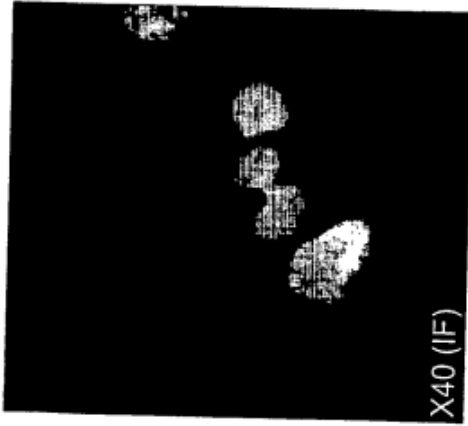


Fig. 5c

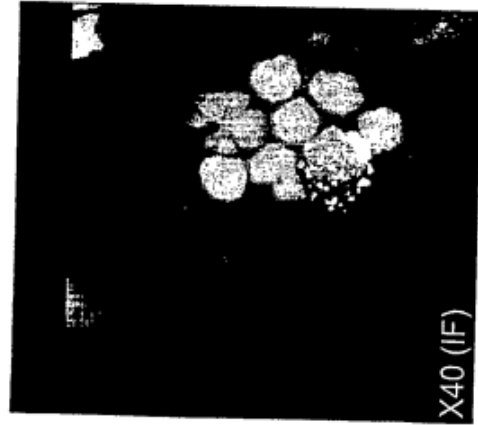






Fig. 6a

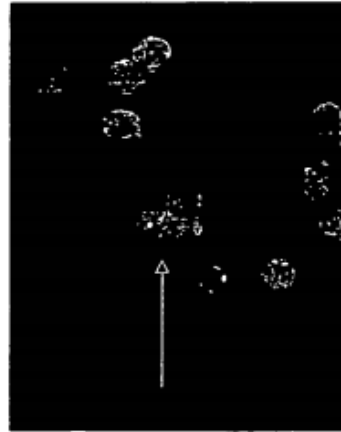


Fig. 6b

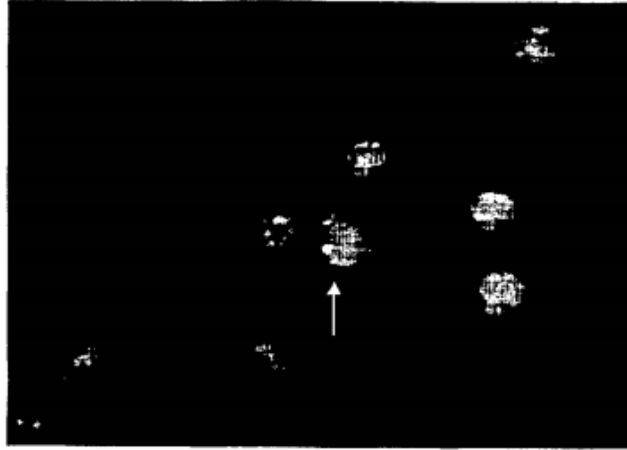


Fig. 7a

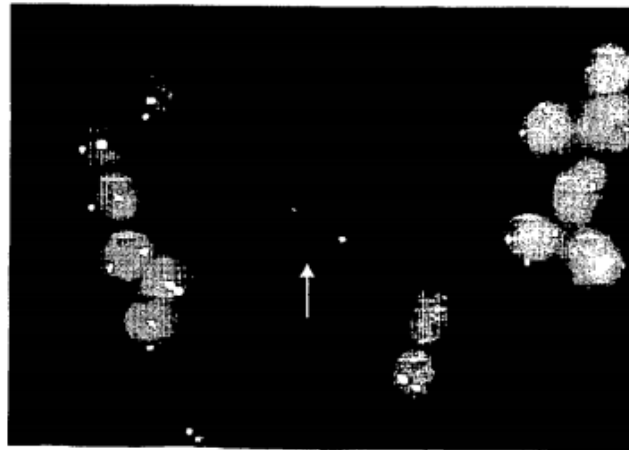


Fig. 7b

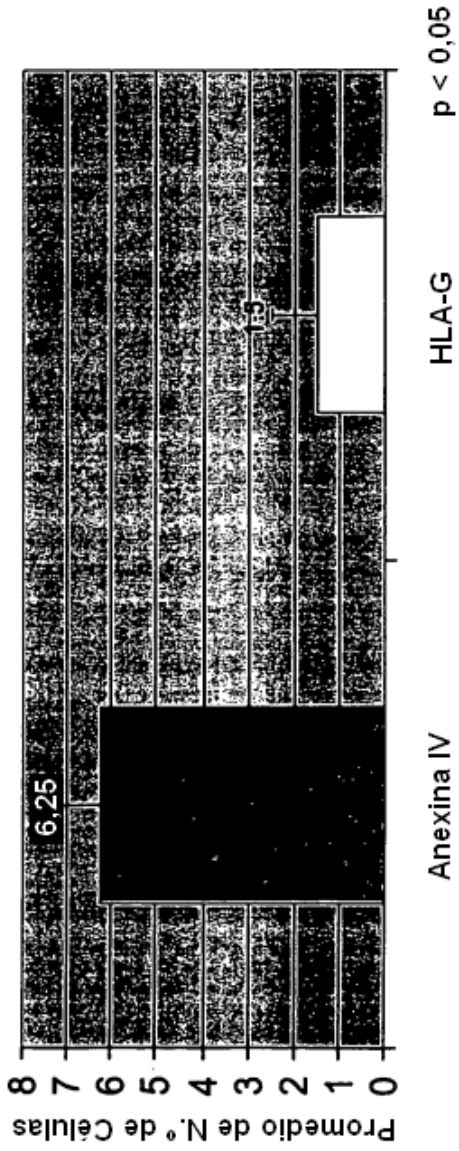


Fig. 8



Fig. 9